PROTOPLASMA

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

ROBERT CHAMBERS
NEW YORK

NOBURÔ KAMIYA
OSAKA

SIEGFRIED STRUGGER
MÜNSTER

HERAUSGEGEBEN VON

JOSEF SPEK
ROSTOCK

FRIEDL WEBER
GRAZ

KARL HÖFLER
WIEN

BAND XLV, HEFT 2
MIT 10 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 8. AUGUST 1955

WIEN
SPRINGER-VERLAG
1955

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einem berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. Fr. Weber, Pflanzenphysiologisches Institut, Graz, Schubertstraße 51, Österreich, oder

Prof. Dr. J. Spek, Zoologisches Institut, (3a) Rostock, Universitätsplatz, DDR, oder

Prof. Dr. K. Höfler, Pflanzenphysiologisches Institut, Wien I, Dr.-Karl-Lueger-Ring 1, Österreich

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mölkerbastei 5
Fernsprecher: U 26-5-60 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfertig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Bezieher der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1½ Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen" und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostenersatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

XLV. Band — Inhaltsverzeichnis — 2. Heft

Abhandlungen

Seite

Pfeiffer, H. H.: Quantitative Versuche über das Fadenziehvermögen von Fibroblasten . 157

Amelunxen, F.: Beobachtungen über die Entwicklung der Eiweißspindeln bei Cactaceen (Vorläufige Mitt.) 164

Höfler K., und H. Schindler: Volle und leere Zellsäfte bei Algen 173

Fasse-Franzisket, Ursula: Die Teilung der Proplastiden und Chloroplasten bei *Agapanthus umbellatus* L'Hérit 194

Amelunxen, F.: Über die Strukturanalyse der Eiweißspindeln der *Cactaceae* (Vorl. Mitt.) 228

Stubbe, W., und D. v. Wettstein: Zur Struktur erblich verschiedener Chloroplasten von *Oenothera* 241

Penso, G.: Cycle of Phage Development Within the Bacterial Cell 251

Mühlethaler, K.: Untersuchungen über die Struktur und Entwicklung der Proplastiden 264

Kurze Mitteilung

Kinzel, H.: Ein einfaches Mikrokolorimeter 280

Referat 284

William Seifriz ist nicht mehr. Ein rascher Tod hat seinem Leben zu früh das Ende bereitet. Es war das Leben eines selbstlosen Mannes von vornehmer Gesinnung und vielseitigem Interesse, sein Streben und Forschen war mit unermüdlicher Hingabe der Wissenschaft von der lebenden Materie gewidmet. „William Seifriz" stand auf dem Titelblatt der Zeitschrift Protoplasma vom ersten Tage ihres Erscheinens an, und ihre Gründung wäre 1926 kaum gelungen ohne seine Mitarbeit und ohne seinen Namen, der damals schon in der Wissenschaft der Neuen und der Alten Welt einen weitreichenden Klang besaß. Seifriz hat der Protoplasma-Zeitschrift in guter und auch in schlechter Zeit unverbrüchlich die Treue bewahrt, Herausgeber, Verlag und Mitarbeiter werden ihm dafür dankbar sein und bleiben über seinen Tod hinaus. Wenn jetzt durch einen schmerzenden Strich der Name William Seifriz auf dem Titel seiner Zeitschrift gelöscht werden muß, so wird er damit nicht gelöscht aus der Geschichte der Protoplasmatik, denn dort hat er für immer seinen Platz als der erfolgreiche Wiedererwecker der Erforschung des lebenden Protoplasmas. Seifriz' wissenschaftliche Leistung soll von berufener Seite in dieser Zeitschrift eingehend gewürdigt werden. Alle, die ihm nahestanden, wissen es, er war nicht nur als Forscher eine bei aller Bescheidenheit ausgeprägte Persönlichkeit, er war auch ein Mensch, edel, hilfreich und gut.

Graz, im August 1955.

Quantitative Versuche über das Fadenziehvermögen von Fibroblasten

Von

Hans H. Pfeiffer

Aus dem Laboratorium für Polarisations-Mikroskopie, Bremen

Mit 7 Textabbildungen

(Eingelangt am 4. März 1955)

Unter Fadenziehvermögen oder Spinnbarkeit ist die Fähigkeit verschiedenartigster Materialien zur Bildung reversibler flüssiger Fäden von dynamischer Beständigkeit zu verstehen. Die quantitative Analyse der Abhängigkeit dieses Vermögens des Protoplasmas von anderen seiner Merkmale sei der Gegenstand der folgenden Mitteilung.

Technische Vorbemerkungen

Das Versuchsmaterial bilden Fibroblasten (Abb. 1), welche aus dem Herzmuskel der Maus bei Kulturen in vitro in Fischers supplementary medium V-614 [3, 9] erhalten werden.

Werte des Fadenziehvermögens sind nicht wie bei Nitschmann und Schade [8] mit deren Spinnwaage nach der Orientierungsviskosität erhalten worden. Vielmehr ist bei den Messungen unter Aufgeben weniger geeigneter älterer Verfahren (Fano, Aggazzotti, Jochims, Tammann und Tampke) und unter Benutzung von Erfahrungen von H. Erbring und von Gunter [5] die Fadenlänge beim Ausziehen bis zum Abreißen bestimmt worden [18]. Geeignet dazu ist nach Thieles Erfahrungen ein kleiner Synchronmotor 220 V, 50 Hz, 0,5 A, 3000 Rotationen/min, dessen Drehzahl auf $66^2/_3$ reduziert worden ist (Schaltung s. in Abb. 2). Bei Schwanken der Frequenz des Wechselstromnetzes um $\pm$ 0,5 Hz würde die Fehlergrenze des Motors mit $\pm$ 1% genügend niedrig bleiben. Die Schnur der Trommel des Antriebsmechanismus wird über Rollen mit dem zwischen Stahlsaiten des bewegenden Prismas und der daran befestigten auswechselbaren Glascapillare verbunden, welche in den darunter befindlichen Fibroblasten eintaucht und beim Motorantrieb aus ihm den Protoplasmafaden auszieht.

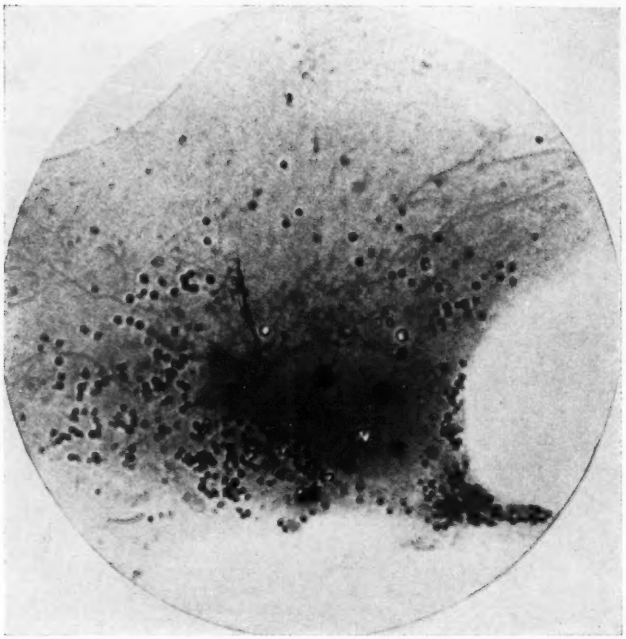


Abb. 1. Lebender Fibroblast *in vitro* vom Herzmuskelgewebe der Maus ($^{1700}/_{1}$, verkl. auf $^{1360}/_{1}$) in Hellfeld-Interferenzkontrast. (Nach Cooke, Troughton & Simms Publication 2595.)

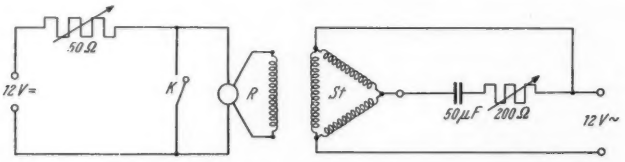


Abb. 2. Schaltungsschema des als Synchronmotor dienenden Drehfeldgebers der STEG. Im Stator *St* wird durch den Elektrolytkondensator ein Drehfeld von $\sim 50\,\mu$F erzeugt. Durch den in Serie damit liegenden Widerstand von $200\,\Omega$ läßt sich die Phasenlage des Rotors *R* in bezug zum Wechselstrom variieren. Bei dem von einer Gleichstromquelle gespeisten Rotor entsprechen sich volle Umdrehung und Periode. Der Vorwiderstand von $50\,\Omega$ soll einen Kurzschluß auf der Gleichstromseite verhindern, die Einregulierung der optimalen Stromstärke ermöglichen und durch Über- oder Untererregung entstehende Pendelschwingungen ausschließen. Zum Anlassen wird bei eingeschaltetem Gleichstrom der Schalter *K* geschlossen und durch dessen Öffnen dann der Motor in Synchronismus hineingezogen.

Bei der phasenmikroskopischen Untersuchung wird das mittlere Dunkel-A′-Beugungsplättchen anderen optischen Anordnungen vorgezogen. Der da-

bei nicht zu vermeidende helle Lichthof um die Zellkonturen bleibt aus bei einer dem Dyson-Interferenzmikroskop angepaßten Versuchsanordnung (Original erhältlich bei Cooke, Troughton & Simms Ltd., York/England). Dessen optisches System (Abb. 3) besteht unterhalb des Objekts (*p*) aus einem aplanatischen Spezialkondensor (*c'*) 1,3 n. A. und einer mit sehr schwach divergierenden Horizontalflächen versehenen Keilplatte (*k'*), oberhalb aus einer ebensolchen Keilplatte (*k''*) und einem sphärischen Block spezieller Bauart (*c''*), an welchen sich das Objektiv (*o*) anschließt. Die Horizontalflächen der Keilplatten tragen einen Al-Überzug, während der sphärische Block an der unteren Fläche axial und an der oberen außerhalb des zentralen Bereichs stark versilbert ist [13]. Für den phasenmikroskopischen Gebrauch der Vorrichtung muß das Gesichtsfeld zuvor gleichmäßig ausgeleuchtet werden (Tilgung der Interferenzbanden im Gesichtsfelde mittels Bewegung der Mikrometerschraube). Zugleich dient das Instrument zu interferometrischer Messung der Fibroblasten-Dicke [7], deren Kenntnis zur Einhaltung konstanter Menge des ausgesponnenen Materials erforderlich ist.

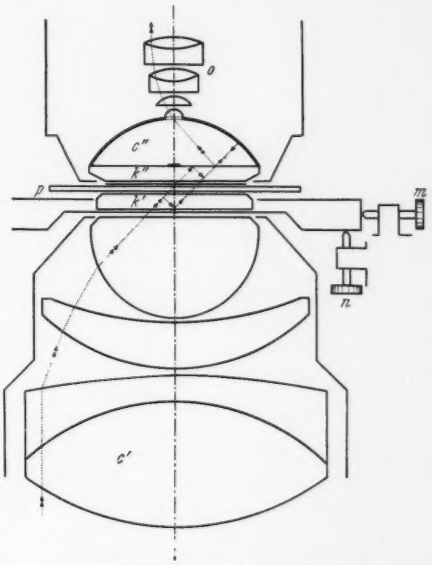


Abb. 3. Schematischer Schnitt durch das optische System des Dyson-Interferometermikroskops nach Cook, Troughton & Simms Publication 2595. (Buchstabenerläuterung im Text.)

Zu Bestimmungen der Fließelastizität [2, p. 31] dient eine menstroskopische (oestroskopische) Apparatur nach Art jener von Scott Blair und Mitarbeitern [14, 15], die sich für solche Aufgaben gut bewährt hat [4]; für die vorliegende Anwendung müssen die Dimensionen des Menstroskops herabgesetzt werden, worüber zu gegebener Zeit an anderer Stelle berichtet werden möge.

Messungen der Doppelbrechung werden nach Braces Methode mit einem Kompensator variablen Azimuts und konstanter Retardation (drehbare $\lambda/30$-Glimmerplatte) und einem drehbaren Halbschattenkeil nach Macé de Lepinay [10] vorgenommen. Nur in vereinzelten Fällen sind die Δn-Größen aus Retardationskurven nach der densitometrischen Anordnung von Swann und Mitchison [17] ermittelt worden.

Ergebnisse

Die Versuche zeigen, daß Störungen durch mechanische Einflüsse vom Antriebsmechanismus auf die Fadenlänge weitgehend ausgeschaltet bleiben. Zur Vermeidung von Schwankungen der Meßwerte durch wechselnde Temperatur, wie sie zu erwarten sind [6], werden am besten alle

Messungen bei einer festgelegten Temperatur, in den hier mitgeteilten Versuchen bei $\pm 18^0$ C, durchgeführt. Da es sich beim Fadenziehvermögen um ein sehr komplexes Phänomen handelt, müssen jeweils eine Vielzahl anderer als die geprüften Faktoren sorgfältig konstant gehalten werden. Dann aber zeigen die Versuche bemerkenswerte und auch quantitativ gut reproduzierbare Gesetzmäßigkeiten [11].

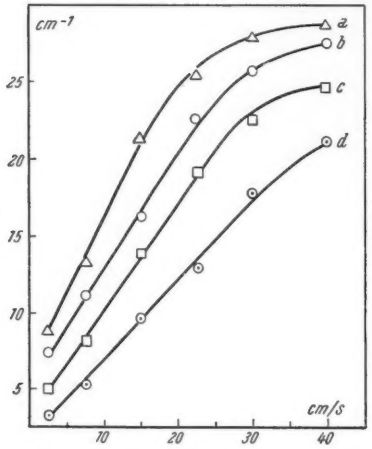


Abb. 4. Abhängigkeit der Fadenlänge (cm^{-1}) von der Ausziehgeschwindigkeit (cm/s) bei einer von Kurve *a* bis *d* abnehmenden Eintauchtiefe resp. ausgezogenen Substanzmenge.

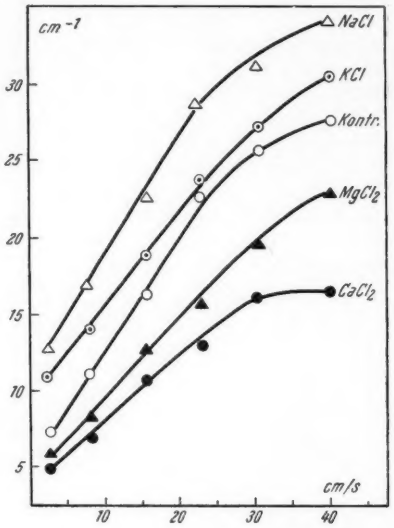


Abb. 5. Abhängigkeit der Fadenlänge (cm^{-1}) von der Ausziehgeschwindigkeit (cm/s) bei Wechsel der Viskosität des Fibroblasten-Protoplasmas, verursacht mittels 0,65%iger Chloridlösungen von Na, K, Mg und Ca (mittlere Kurve: Kontrolle).

1. In Abhängigkeit von der Ausziehgeschwindigkeit wachsen die Fadenlängen anfangs linear, später in geringerem Grade und nehmen schließlich wiederum ab (Abb. 4).

2. Bei konstanter Ziehgeschwindigkeit wächst die Fadenlänge proportional zu der interferometrisch kontrollierten Eintauchtiefe (Abb. 4) und mindestens anfangs mit dem Lumen der eingetauchten Capillare, d. h. wohl mit der an ihr adhärierenden Substanzmenge, wobei die beim Abreißen der Fäden faktisch festgehaltene Protoplasmamenge nicht sicher mit der am Prozeß beteiligten Substanzmenge identisch zu sein braucht.

3. Versuche über die Beeinflussung der Viskosität mittels 0,65%iger Salzlösungen ergeben eine maximale Fadenlänge bei mittlerer Viskosität

(Abb. 5), wenn deren Herabsetzung bei einwertigen Kationen in der Reihe Na > K, bei zweiwertigen in der Folge Ba > Mg > Ca [16, p. 23, 148] angenommen wird.

4. Auch mit wechselnder Fließelastizität, welche menstroskopisch (oestroskopisch) kontrolliert wird, nimmt die Fadenlänge anfangs zu, durchläuft ein Maximum und nimmt dann relativ plötzlich ab (Abb. 6). Der schlecht reproduzierbare Abfall der Kurven ist in der Abbildung weggelassen worden.

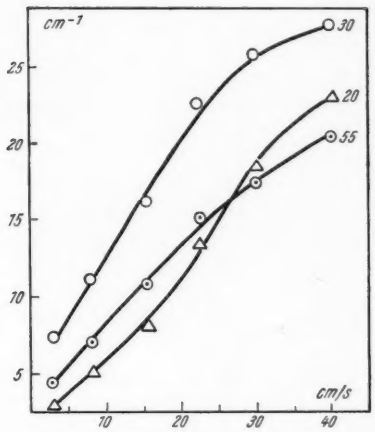


Abb. 6. Beeinflussung der Relation von Fadenlänge (cm^{-1}) zu Ausziehgeschwindigkeit der Fäden (cm/s) durch Unterschiede der Fließelastizität ($\Theta = 20$, 30 und 55°).

5. Ganz wie erwartet [12] zeigt sich bei einer Zunahme der Fadenlänge resp. der Ausziehgeschwindigkeit auch eine Koppelung mit verbesserter Orientierung der Leptonen und mit der darauf hinweisenden Zunahme der Δn (Abb. 7).

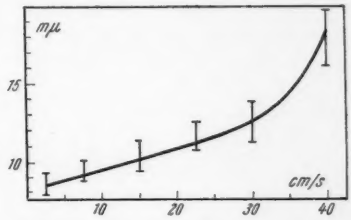


Abb. 7. Proportionalität zwischen Ausziehgeschwindigkeit (cm^{-1}) der Protoplasmafäden und der dabei hervorgerufenen Doppelbrechung ($m\mu$).

Diskussion

Im ganzen gesehen finden wir also ein ähnliches Verhalten des Protoplasmas, wie es auch von anderen Materialien nachgewiesen worden ist [5, 6, 18]. Das Protoplasma auch der untersuchten Fibroblasten dürfte nach manchen früheren Versuchen [Zusammenfassung s. 12a] als Non-Newtonsche Flüssigkeit anzusehen sein [16], deren Strukturviskosität von ihrem Aufbau aus „Leptonen" nach der Nomenklatur meiner auch von Bretschneider [1] vertretenen Terminologie herrührt. Die vorstehend zusammengestellten Befunde der Spinnversuche des Protoplasmas lassen sich dann — meist in Bestätigung zu Überlegungen der vorliegenden Literatur — sämtlich aus dem Fließverhalten interpretieren.

So muß mit wachsender Ausziehgeschwindigkeit die Fadenlänge zunehmen, solange sie nicht die Geschwindigkeit des Nachfließens übersteigt. Das danach zu erwartende Maximum der Fadenlänge muß bei einer um so

höher gelegenen Ausziehgeschwindigkeit auftreten, je geringer die Viskosität ist.

Sofort einleuchtend ist ferner die Beeinflussung der Fadenlänge von der Eintauchtiefe und der damit zusammenhängenden Menge der ausgezogenen Substanz.

Die Viskosität beherrscht die Fadenlänge entsprechend der Differenz der Geschwindigkeiten des Nachfließens und des Zurückfließens der Substanz bei ihrem Ausziehen, indem mit zunehmender Viskosität die an dem Prozeß beteiligte Flüssigkeitsmenge proportional abnehmen muß.

Der Einfluß der Fließelastizität auf die Fadenlänge ist wohl so zu deuten, daß steigende mechanische Belastung der Flüssigkeit wie eine Viskositätszunahme wirkt. Sobald die Konsistenz der Substanz derart wächst, daß die Kohäsionskräfte das Nachfließen einigermaßen hemmen oder schließlich verhindern, muß also die anfängliche Zunahme der Fadenlänge mit steigender Fließelastizität in ihr Gegenteil umschlagen.

Die nachgewiesene Zunahme der Doppelbrechung proportional der Ausziehgeschwindigkeit beweist [vgl. 12, 12 a] die verbesserte Orientierung der protoplasmatischen Leptonen in den ausgezogenen Fäden.

Mit den untersuchten Effekten sind aber noch nicht alle am Fadenziehen des Protoplasmas beteiligten Faktoren erfaßt. Wahrscheinlich sind auch Oberflächenspannung und Adhäsion, ja vielleicht auch interleptonische Bindungskräfte (heteropolare Nebenvalenzen von H-Brücken, homöopolare von Van-der-Waals-Bindungen und Kombinationen beider) daran beteiligt, die aber noch nicht experimentell variiert worden sind. Darüber hinaus dürfte die *causa efficiens* des Phänomens durch ein komplexes Zusammenwirken vornehmlich von Faktoren des molekularen Bereiches bedingt sein. Der Aufbau aus Leptonen [12, 12 a, 16] läßt die Voraussetzung des Vorkommens langgestreckter Partikel beim Protoplasma wohl stets als realisiert ansehen. Nach der vorliegenden Literatur über das entsprechende Verhalten der verschiedensten Kolloide [18] sollen die „Fadenmicelle" durch freie Drehbarkeit eine genügende Beweglichkeit haben, intraleptonische Bindungen aber möchten als Ursache unbedeutsam sein, und thixotropes Verhalten scheint antagonistisch zu wirken. Es wird weiterer Anstrengungen bedürfen, um die Berechtigung dieser Auffassung auch für das Protoplasma zu belegen.

Summary

A modified technique for measuring the length of threads pulled out from fibroblasts grown in vitro has been given which is applicable to an exact determination of the ability of Fadenziehen (thread-drawing). Measurements have been done, for that purpose, also of the thickness of the fibroblasts layer by means of an interference microscope, of the flow elasticity by means of Scott Blair's menstroscope (oestroscope), and of the birefringence by means of two very accurate methods.

The lengths of the threads pulled out show a maximum amount at middle values of speeds of pulling out, of viscosity (estimated by the behaviour towards salt solutions with different cations), and of flow elasticity. The values

increase in proportion with the depth of diping, with the luminas of the capillaries, and with increase of leptonic orientation or birefringence.

All the results are to interprete with differences between the distinct speeds of pulling out the threads of protoplasm and of its flowing after and back. The results are, finally, discussed particularly in relation to the possible manner which the so-called Fadenziehen of protoplasm depends on. In as much as the investigated processes are conducted by viscosity and flow elasticity, but perhaps also by surface tension, adhesion, interleptonic bonds of protoplasmic material &c., the *causa efficiens* of the ability results from a distinct co-operation of many factors mostly of the molecular range.

References

[1] Bretschneider, L. H., 1952: Survey of biological progress *2*, 223. Academic Press Inc., New York.

[2] Burgers, J. M., and G. W. Scott Blair, 1949: Report on the principles of rheological nomenclature. N. Holl. Publ. Co., Amsterdam.

[3] Fischer, A., 1946: Biology of tissue cells. Gyldendal, Copenhagen.

[4] Glover, F. A., 1954: Proc. 2nd intern. congr. Rheology Oxford, 389. Butterworths Sc. Publ., London.

[5] Gunter, G. S., 1949: Austral. J. exper. Biol. a. Med. Sci. *27*, 256.

[6] Jochims, J.: Z. Kinderkh. *45*, 342 (1928); *47*, 269 (1929); Protoplasma *9*, 304 (1930); Kolloid-Z. *61*, 250 (1932).

[7] Mayer, H., 1950: Physik dünner Schichten *1*. Wiss. Verlagsges., Stuttgart.

[8] Nitschmann, H., und J. Schade, 1948: Helvet. chim. Acta *31*, 297.

[9] Parker, R. C., 1950: Methods of tissue culture, 2nd ed. Paul B. Hoeber Inc., New York.

[10] Pfeiffer, H. H., 1949: Das Polarisationsmikroskop als Meßinstrument in Biologie und Medizin, 53 und 64. Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig.

[11] — Discussion note at Eli Lilly & Co. colloquion on connective tissues held at Indianapolis (Ind.), Sept. 1951.

[12] — 1953: Protoplasma *42*, 291.

[12a] — 1954: Proc. 6th intern. Bot. congr. Stockholm, 361. Almquist & Wiksells, Uppsala.

[13] — 1954: Mikroskopie (Wien) *9*, 318.

[14] Scott Blair, G. W., 1952: In A. Frey-Wyssling, Deformation and flow in biological systems, 447, 452. N. Holl. Publ. Co., Amsterdam.

[15] — A. T. Cowie, and F. M. V. Coppen, 1942: Nature (London) *149*, 609.

[16] Seifriz, W., 1952: In Frey-Wyssling, l. c. 1, 23 und 148.

[17] Swann, M. M., and J. M. Mitchison, 1950: J. exper. Biol. *27*, 226.

[18] Thiele, H., und H. Lamp, 1952: Kolloid-Z. *129*, 23.

Beobachtungen über die Entwicklung der Eiweißspindeln bei Cactaceen

(Vorläufige Mitteilung)

Von

F. Amelunxen

Aus dem Botanischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster

Mit 18 Textabbildungen

(Eingelangt am 18. März 1955)

Cytoplasmatische Einschlußkörper oder X-bodies sind in viruskranken Pflanzen oft die ersten mikroskopisch sichtbaren Symptome einer Virose. Iwanowski (1903), Goldstein (1924, 1926) und Sheffield (1931, 1934) haben die X-Körper als amorphe Einschlüsse beschrieben, die wie Zusammenballungen von Plasma aussehen und in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren eine wechselnde Gestalt annehmen können. Sie entstehen im Cytoplasma zunächst in Form kleiner Anhäufungen, die in der Regel zu einem größeren Klumpen verschmelzen. Im Innern der X-Körper treten nach einiger Zeit Kristalle auf, und schließlich wird die ganze Masse in Kristalle umgewandelt, u. zw. in hexagonale Platten oder in feine Nadeln (Sheffield 1931, 1934).

Auch bei spindelführenden Cactaceen sind cytoplasmatische Einschlußkörper nach Art der beschriebenen X-bodies beobachtet worden. Bei *Rhipsalis cereuscula* sind sie kugelig, scharf vom Cytoplasma abgesetzt und von stark lichtbrechenden Granula unterschiedlicher Größe erfüllt (Weber und Kenda 1931). In den X-Körpern von *Opuntia subulata* werden neben einer feinen Granulation bisweilen kleine, doppelbrechende Kriställchen sichtbar. Sie scheinen sich so anzuordnen, daß sie dann als „Spindel" aus dem X-body herauswachsen. Oft sind die Eiweißspindeln zum Teil von dem feingranulierten X-body eingehüllt. Die Kriställchen können aber auch ungeordnet im X-Körper verbleiben (Weber, Kenda und Thaler 1952). In anderen Zellen finden sich Einschlußkörper, die ein dichtes Knäuel feinster Eiweißfäden enthalten (Weber und Kenda 1952). Besonders große cytoplasmatische Einschlußkörper kommen in den Blättern von *Pereskiopsis pititache* vor. Sie haben — offenbar je nach ihrem Entwick-

lungsstadium — ein verschiedenes Aussehen: die Anzahl der Granula wechselt, kleinere oder größere Vakuolen treten auf, und nicht selten werden Stäbchen oder Spindeln in ihnen beobachtet. In älteren X-Körpern verschwinden die Granula immer mehr, und es bleibt nur noch ein Bündel von Eiweißkristalloiden übrig (Weber, Kenda und Thaler 1952). Schon Mikosch wies 1890 darauf hin, daß bei *Oncidium microchilum* eine granuläre Plasmamasse, die man heute als X-Körper bezeichnen würde, das Material für den Aufbau der Eiweißspindeln liefert.

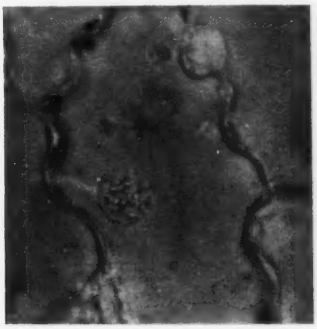


Abb. 1.

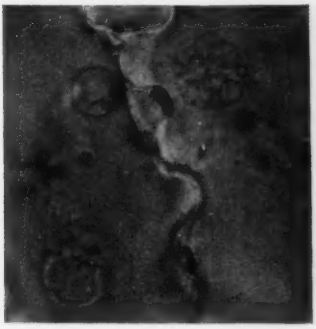


Abb. 2.

Abb. 1. Vornehmlich granuläre cytoplasmatische Einschlußkörper in einer Epidermiszelle eines Blütenblattes von *Opuntia monacantha*. 840×.
Abb. 2. Blütenblatt-Epidermiszellen von *Opuntia monacantha*. Rechte Zelle: X-Körper mit Granula und zahlreichen Blasen; linke Zelle: X-Körper aus wenigen großen Blasen und wenigen Granula. 840×.

In dieser Arbeit sollen einige Beobachtungen über den Entwicklungsverlauf der Eiweißspindeln aus den cytoplasmatischen Einschlußkörpern mitgeteilt werden. Die Untersuchungen wurden an Blüten- und Tragblättern von *Opuntia monacantha* und an Blütenblättern von *Opuntia lemaireana* und *Opuntia hersfeldii* durchgeführt. Die Blütenblätter wurden den Blüten vor, während und nach ihrer Entfaltung bis zum Zeitpunkt der ersten Welkungserscheinungen entnommen.

In den Blütenblatt-Epidermiszellen einer entfalteten Blüte von *Opuntia monacantha* kommen kleinere X-Körper in wechselnder Anzahl neben größeren vor (Abb. 1). Zuerst sind in ihnen lediglich stark lichtbrechende Granula oder schleifenähnliche Gebilde zu erkennen. Werden die X-Körper größer, dann treten zahlreiche kleine Blasen auf (Abb. 2, rechte Zelle), und schließlich sind nur noch wenige, aber große, sich gegenseitig abplattende Blasen vorhanden (Abb. 2, linke Zelle). Bei dieser Entwicklung vermindert sich die Zahl der Granula bzw. Schleifen immer mehr. Die Blasen der X-Körper entmischen sich in eine Vakuole und einen von ihr im Brechungsindex deutlich unterschiedenen Randteil. Dieser kann die Vakuole entweder allseitig umfassen, oder er ist ihr kappenförmig aufgesetzt. Die

Größenverhältnisse sind dabei verschieden: es lassen sich X-Körper beobachten, in denen die Randteile klein und die Vakuolen groß entwickelt sind. In den beiden Abbildungen 3 und 4 dagegen sind die Randteile voluminös und die Vakuolen nur noch klein ausgebildet. In den Randteilen entstehen stabförmige Kristalloide (Abb. 3 und 4). Die Vakuolenflüssigkeit wird wahrscheinlich vom Cytoplasma resorbiert, wie dies auch Molé-Bajer (1953) für einen ähnlichen Bildungsvorgang von Eiweißspindeln bei *Pereskiopsis spathulata* beschrieben hat. Die entstandenen Kristalloide liegen teilweise in den Randteilen, teilweise frei im Cytoplasma (Abb. 3 und 4). Wie sie sich nachher zu Spindeln anordnen, konnte nicht festgestellt werden. Ihre Aggregation zu Eiweißspindeln ist jedoch anzunehmen, da in benachbarten Zellen typische Eiweißspindeln anzutreffen sind (Abb. 4).

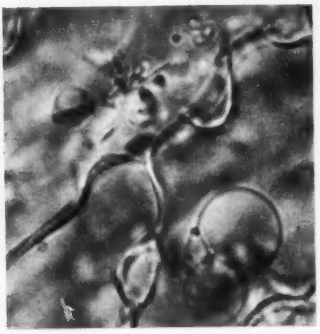


Abb. 3. Blütenblatt-Epidermiszellen von *Opuntia monacantha*. Entmischung der Blasen in eine Vakuole und einen Randteil. Im Randteil befindet sich ein Kristalloid. Weitere Kristalloide liegen regellos im Cytoplasma. In der rechten Zelle ist ein blasiger X-Körper zu sehen. 840×.

Bei *Opuntia lemaireana* und *Opuntia hersfeldii* ist ein besserer Einblick in den morphologischen Entwicklungsablauf möglich, weil bei diesen Arten in den X-bodies nur kleine Blasen zu beobachten sind bzw. eine Blasenbildung ganz unterbleibt. — In den Epidermiszellen von *Opuntia lemaireana* sind im Cytoplasma an mehreren Stellen stark lichtbrechende Granula zu sehen, die sich meist in Kernnähe zu granulären und geringfügig vakuolisierten Klumpen vereinigen (Abb. 3 *a* und *b*). Dies stimmt mit der oben gegebenen X-Körper-Entstehung überein. Die Granula können sich in intensiver Bewegung befinden, die wahrscheinlich durch eine B. M. B. hervorgerufen wird. Nach 20 Minuten waren in einem X-body, bei dem dies der Fall war, die ersten langen und dünnen Kristalloide zu beobachten (Abb. 6). Deren Bildung ist bei *Opuntia lemaireana* aber auf zweierlei Wegen möglich, u. zw. einmal — in bekannter Weise — durch einen Übergang der Granula innerhalb der X-bodies in nadelförmige, gerade gestreckte Kristalloide, bis schließlich der ganze X-Körper von geordnet oder ungeordnet liegenden Nadeln erfüllt ist (Abb. 7). Zum anderen können sich aus den Granula aber auch kurze, stark lichtbrechende und meist leicht gebogene Schleifen entwickeln (Abb. 8). Sie haben eine Breite von 0,4 bis 0,5 μ; ihre Länge variiert zwischen 2 und 3 μ. Von derartigen Schleifen erfüllte X-bodies sind häufig dem Kern benachbart, oder sie umfassen ihn mehr oder weniger vollständig (Abb. 10). Vakuolen fehlen in diesem Zustand. Die Schleifen verlassen die X-Körper, die meist nicht mehr scharf vom Cytoplasma abgesetzt sind, und werden durch die Cytoplasmaströmung passiv bewegt. Die nunmehr gerade gestreckten Schleifen legen sich

im Cytoplasma der Länge nach aneinander (Abb. 9 *a*). Im Laufe kurzer Zeit werden diese Lateral-Aggregate unter Abnahme der Lichtbrechung homogener und nehmen schließlich das Aussehen der bekannten Kristalloide bzw. Eiweißspindeln an (Abb. 9 *b*). Deren Breite entspricht der Länge der „verschmolzenen" Schleifen. — In der Epidermiszelle der Abbildung 10 wurde zunächst durch Parallel-Lagerung von Schleifen eine kleine Eiweißspindel gebildet. Danach erfolgte eine weitere Anlagerung von Schleifen, die in 35 Minuten in den Spindelverband einbezogen wurden.

Abb. 10. Blütenblatt-Epidermiszelle von *Opuntia lemaireana*. Ein von Schleifen erfüllter X-Körper umgibt den Zellkern. Neben dem Zellkern eine kleine Eiweißspindel mit angelagerten Schleifen. 800×.

Deutlicher wird diese Entwicklungsweise von Eiweißspindeln bei *Opuntia hersfeldii*. Die Epidermiszellen der entfalteten Blütenblätter enthalten X-bodies, die regelmäßig Schleifen führen (Abb. 11). Die direkte Bildung von Kristalloiden im X-Körper konnte niemals beobachtet werden, so daß hier die Bildung der Eiweißspindeln wohl ausschließlich auf dem

Abb. 12.

Abb. 13.

Abb. 12. Blütenblatt-Epidermiszellen von *Opuntia hersfeldii*. X-Körper mit Schleifen in Nachbarschaft eines Zellkernes.

Abb. 13. Schleifen und locker gebaute Eiweißspindeln in einer Blütenblatt-Epidermiszelle von *Opuntia hersfeldii*. 840×.

Wege über die kurzen Schleifen erfolgt. — In den zuerst granulären, aber stets vakuolenfreien X-bodies entstehen in 24 Stunden zahlreiche Schleifen (Abb. 12), die sich im Laufe eines weiteren Tages in gleicher Weise zu lockeren Spindeln zusammensetzen. In Übergangsstadien findet man Schlei-

fen und lockere Spindelteile nebeneinander liegen (Abb. 13). Die Aggregation und Verschmelzung von Schleifen wurde bei dieser Art in mehreren Fällen beobachtet.

Eine nähere Feinbauanalyse der Schleifen ist bei *Opuntia hersfeldii* mit Hilfe des Polarisationsmikroskops möglich. Prüft man die nach Zerfall eines X-bodies im Cytoplasma isoliert liegenden Schleifen auf ihre optischen Eigenschaften im Polarisationsmikroskop, so findet man bei ihnen immer dann Doppelbrechung, wenn ihre Längsachse senkrecht zur Diagonalen zwischen Polarisator und Analysator gestellt ist (Schema Abb. 14). Dies besagt, daß sich die Schleifen sehr wahrscheinlich aus senkrecht zu ihrer

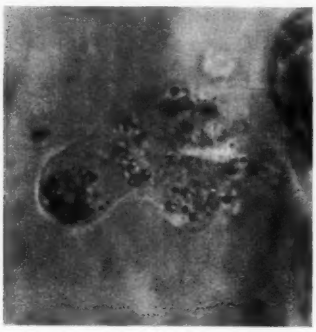


Abb. 16.

Abb. 18.

Abb. 16. Epidermiszelle eines Tragblattes von *Opuntia monacantha*. Bildung einer Stachelkugel im X-Körper. Im linken Teil der X-Körper-Grundsubstanz stark lichtbrechende Schleifen; im rechten Teil sind die Schleifen stark aufgelockert. 920×.
Abb. 18. Epidermiszelle eines Tragblattes von *Opuntia monacantha*. Linke Zelle: frei im Plasma liegende Stachelkugeln: rechte Zelle: Stachelkugel in der X-Körper-Grundsubstanz. 840×.

Längsachse gerichteten, fädigen oder stäbchenartigen Struktureinheiten aufbauen. — Nun gelingt es in seltenen Fällen, derartige Strukturen auf lichtmikroskopisch-photographischem Wege sichtbar zu machen. Bei *Opuntia monacantha* wurde in einem Sproßglied ein sehr seltenes, inselweises Vorkommen von „quergestreiften" Eiweißspindeln festgestellt (Abb. 15). Sehr wahrscheinlich handelt es sich auch hier um parallelgelagerte Schleifen, die nun aber in sich aufgelockert sind und damit nicht mehr homogen erscheinen, sondern ihre strukturelle Zusammensetzung aus feinen Stäbchen erkennen lassen. Die Länge dieser Stäbchen beträgt 0,4 bis 0,5 μ; sie ist also identisch mit der Breite der oben beschriebenen Schleifen.

Zwischen den homogenen, stark lichtbrechenden und den aufgelockerten Schleifen (Querstreifen) der soeben erwähnten Spindeln vermitteln die Stachelkugeln von *Opuntia monacantha*. Sie wurden regelmäßig in den Epidermiszellen der Tragblätter junger Cladodien gefunden. — Die Abbildung 16 zeigt im linken Teil des X-Körpers die homogenen, stark licht-

brechenden Schleifen; im rechten Teil sind sie dagegen aufgelockert und nur noch schwach lichtbrechend. In den meisten Epidermiszellen kommen aber X-bodies vor, die entweder nur stark lichtbrechende, unregelmäßig orientierte Schleifen enthalten (Abb. 17 *a*) oder diese nur in aufgelockerter Form in der für die Stachelkugeln charakteristischen Anordnung besitzen (Abb. 17 *b*). Die fertigen Stachelkugeln liegen frei im Plasma. Eine besondere Grundsubstanz des Einschlußkörpers wie in den Abbildungen 16 und 18 ist dann nicht mehr zu sehen.

Vergleicht man beide Arten der Entwicklung von Eiweißspindeln, so stellt man fest, daß zwischen der Bildung der Spindeln aus den Granula einerseits und aus den Schleifen andererseits kein prinzipieller Unterschied besteht. Da sich die Schleifen in X-Körpern entwickeln, die zunächst immer granulär sind, darf man beide Bildungen — Granula und Schleifen — wohl als identisch strukturiert ansehen. Im Zuge ihrer Entwicklung können die Schleifen unterschiedlich lang werden; sie können auch lediglich „granuläre Ausmaße" behalten. Dementsprechend verläuft dann die Bildung der geformten Einschlüsse: die Granula ordnen sich schon innerhalb der X-Körper zu Kristalloiden bzw. Eiweißspindeln an. Bei den Schleifen ist das — vielleicht auf Grund ihrer Größe und in dem kleinen Raum des X-Körpers — offenbar nicht möglich, so daß sie sich immer erst nach Zerfall des X-Körpers zu Spindeln zusammenlegen. Vermutlich bilden sich die eigenartigen Stachelkugeln deshalb, weil bei ihnen der X-Körper-Zerfall unterbleibt.

Während die Schleifenbildung sicherlich die eigentliche Vermehrung der Spindelsubstanz darstellt, gleicht die Aggregation der Schleifen zu Eiweißspindeln mehr einem Kristallisationsvorgang: die Abbildungen 9 *c* und *d* zeigen einige Phasen der Entstehung einer Eiweißspindel. In der Figur 9 *c* sind drei Stäbchenreihen einer Eiweißspindel angelagert. Es konnte direkt beobachtet werden, wie nach etwa 8 Minuten die Stäbchen, für die im Spindelverband offenbar „noch kein Platz" vorhanden war, plötzlich abgeschleudert wurden, während die Stäbchen, die in die Eiweißspindeln einbezogen wurden, in 3 bis 5 Minuten den vorhandenen Fibrillen unter Abnahme der Lichtbrechung eingefügt wurden (Abb. 9 *d*).

Die hier beschriebene Entwicklung ermöglicht es, viele der bisher beobachteten Formen entwicklungsgeschichtlich zu verstehen.

Weber und Kenda (1951) fanden in einer Zelle von *Rhipsalis cereuscula* in einer Plasmaansammlung eine Gruppe stark licht- und doppelbrechender Gebilde. An diese traten die Fibrillen einer Eiweißspindel so heran, daß das Bild in auffallender Weise dem Metaphasestadium einer Mitose ähnlich war (s. Protoplasma 41, 113, Abb. 4). Die stark lichtbrechenden Gebilde gleichen in ihrer Form und im optischen Verhalten den oben erwähnten Schleifen, so daß sie mit ihnen wahrscheinlich identisch sind. — In einer anderen Arbeit beschrieben Weber und Kenda (1952) ein seltenes Vorkommen von „gebogenen Virus-Eiweißspindeln mit Zonenstruktur" in Epidermiszellen von *Opuntia subulata* (s. Protoplasma 41, 381, Abb. 5). In diesen Spindeln wechseln doppelbrechende Eiweißkristalle mit der isotropen interfibrillären Substanz ab. Es ist möglich, daß die rhythmische

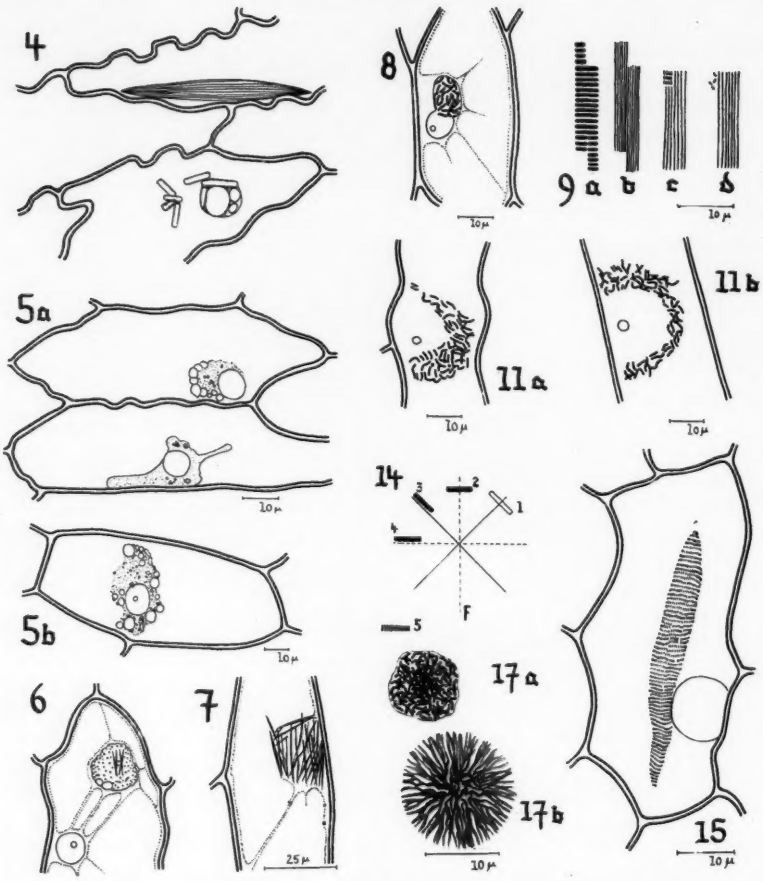


Abb. 4. Blütenblatt-Epidermiszellen von *Opuntia monacantha*. Entmischung der Blasen in Vakuolen und Randteil; Bildung der Kristalloide im Randteil. Daneben freie Kristalloide im Plasma.

Abb. 5. Cytoplasmatische Einschlußkörper in Blütenblatt-Epidermiszellen von *Opuntia lemaireana*.

Abb. 6. Blütenblatt-Epidermiszelle von *Opuntia lemaireana*. Bildung langer und dünner Kristalloide in einem granulären X-Körper.

Abb. 7. Von langen Kristalloiden erfüllter X-Körper in einer Blütenblatt-Epidermiszelle von *Opuntia lemaireana*.

Abb. 8. X-Körper mit Schleifen in der Epidermiszelle eines Blütenblattes von *Opuntia lemaireana*.

Abb. 9. *a* Lateral-Aggregation von Schleifen; *b* Schleifen zu Kristalloiden verschmolzen; *c*, *d* Phasen der Entstehung einer Eiweißspindel. Näheres im Text.

Anordnung durch eine Aggregation von Schleifen entstanden ist. In den einzelnen „Paketen von Eiweißkristallen" muß man allerdings eine mehrfache Schleifen-Aggregation annehmen, da sie — gemessen in Spindellängsrichtung — eine Breite von 6 bis 10 μ aufweisen; die Schleifen sind dagegen nur 0,4 bis 0,5 μ breit.

Zusammenfassung

1. Die cytoplasmatischen Einschlußkörper von *Opuntia monacantha* sind entweder granulär, granulär und blasig oder nur blasig entwickelt. Die Blasen entmischen sich in eine Vakuole und einen Randteil, in dem die Kristalloide gebildet werden.

2. Bei *Opuntia lemaireana* wurden zweierlei X-Körper beobachtet: a) X-Körper, die granulär und wenig vakuolisiert sind. In ihnen bilden sich die nadelförmigen Kristalloide, bis schließlich der ganze X-Körper in Kristalloide umgewandelt ist. b) X-Körper, die von stark lichtbrechenden und leicht gebogenen Schleifen erfüllt sind. Die Schleifen sind 0,4 bis 0,5 μ breit; ihre Länge variiert zwischen 2 und 3 μ. Nach Zerfall des X-Körpers entstehen im Cytoplasma durch Lateral-Aggregation der nunmehr gerade gestreckten Schleifen Kristalloide oder Eiweißspindeln.

3. Die X-Körper von *Opuntia hersfeldii* sind zunächst granulär, aber stets vakuolenfrei. In 24 Stunden entwickeln sich aus den Granula regelmäßig zahlreiche Schleifen; im Verlaufe eines weiteren Tages erfolgt die Parallel-Aggregation zu lockeren Spindeln.

4. Polarisationsoptische Untersuchungen machen es sehr wahrscheinlich, daß die Schleifen aus feinsten, senkrecht zu ihrer Längsachse gerichteten Stäbchen aufgebaut sind.

5. In den Epidermiszellen der Tragblätter junger Cladodien von *Opuntia monacantha* finden sich große X-bodies, die zahlreiche Schleifen enthalten. Unter Abnahme der Lichtbrechung ordnen sich die Schleifen in der für die Stachelkugeln bezeichnenden Weise an. Ein X-Körper-Zerfall wurde bei der Bildung der Stachelkugeln nicht beobachtet.

Literatur

Amadei, G., 1898: Über spindelförmige Eiweißkörper in der Familie der Balsamineen. Bot. Zbl. *73*, 1.

Abb. 11. *Opuntia hersfeldii*, Blütenblatt-Epidermiszellen. X-Körper mit Schleifen in Nachbarschaft der Zellkerne.

Abb. 14. Polarisationsoptisches Verhalten der Schleifen. *F* = Okularfadenkreuz; Schwingungsebenen des Polarisators und Analysators mit *F* übereinstimmend. Nur in Stellung *1* sind die Schleifen doppelbrechend. *5* schematischer Feinbau der Schleifen.

Abb. 15. Epidermiszelle eines Sproßgliedes von *Opuntia monacantha*. „Quergestreifte" Eiweißspindel. In den Querstreifen ist eine Stäbchenstruktur zu erkennen. (Gezeichnet nach einer Mikrophotographie.)

Abb. 17. *a* X-Körper mit zahlreichen Schleifen, *b* ausgebildete Stachelkugel. Aus Epidermiszellen eines Tragblattes von *Opuntia monacantha*. Näheres im Text.

Chmielewsky, V., 1887: Eine Bemerkung über die von Molisch beschriebenen Proteinkörper in den Zweigen von *Epiphyllum*. Bot. Zbl. *31*, 117.

Goldstein, B., 1926: A cytological study of the leaves and growing points of healthy and mosaic diseased tobacco plants. Bull. Torrey Botan. Club *53*, 499.

Gicklhorn, J., 1913: Über das Vorkommen spindelhaltiger Eiweißkörper bei *Opuntia*. Öst. Bot. Z. *63*, 8.

Iwanowski, D., 1903: Über die Mosaikkrankheit der Tabakpflanze. Z. Pflanzenkrankh. *13*, 1.

Kenda, G., I. Thaler und F. Weber, 1951: Kernkristalloide in Stomatazellen? Protoplasma *40*, 624.

Küster, E., 1948: Über die Eiweißspindeln von *Impatiens*. Bot. Zbl. *67*, 27.

— 1934: Anisotrope Fibrillenbündel in Pflanzenzellen. Ber. dtsch. bot. Ges. *52*, 364.

— 1935: Die Pflanzenzelle. Jena.

Mikosch, C., 1890: Über ein neues Vorkommen geformten Eiweißes. Ber. dtsch. bot. Ges. *8*, 33.

Miličić, D., 1953: Viruskörper und Zellteilungsanomalien in *Opuntia brasiliensis*. Protoplasma *43*, 228.

Molé-Bajer, J., 1953: Experimental studies on protein spindles. Acta societatis Botanicorum Poloniae *22*, 811.

Molisch, H., 1885: Über merkwürdig geformte Proteinkörper in den Zweigen von *Epiphyllum*. Ber. dtsch. bot. Ges. *3*, 195.

— 1928: Über ein bei Kakteen vorkommendes, einen roten Farbstoff lieferndes Chromogen. Ber. dtsch. bot. Ges. *46*, 205.

Rinne-Berek, 1953: Anleitung zu optischen Untersuchungen mit dem Polarisationsmikroskop. Stuttgart.

Rosenzopf, E., 1930: Sind Eiweißspindeln Virus-Einschlußkörper? Phyton *3*, 95.

Sheffield, F. M. L., 1931: The formation of intracellular inclusions in solanaceous hosts infected with aucuba mosaic of tomato. Ann. Appl. Biol. *18*, 471.

— 1934: Experiments bearing on the nature of intracellular inclusions in plant virus diseases. Ann. Appl. Biol. *21*, 430.

Sorauer, P., 1954: Handbuch der Pflanzenkrankheiten, Viruskrankheiten. 2. Bd., 6. Auflage. Berlin und Hamburg.

Wakker, J. H., 1892: Ein neuer Inhaltskörper der Pflanzenzelle. Jb. wissensch. Bot. *23*, 1.

Weber, F., 1939: Eiweißspindeln von *Valerianella*. Protoplasma *34*, 148.

— 1951: Viruskörper fehlen den Stomazellen. Protoplasma *40*, 635.

— 1951: Trypanoplasten-Viruskörper von *Rhipsalis*. Phyton *3*, 273.

— 1952: Eiweißpolyeder in *Pereskiopsis*-Virusträgern. Protoplasma *42*, 289.

— 1952: Eiweißspindeln (Viruskörper) in vergilbenden *Pereskia*-Blättern. Öst. Bot. Z. *100*, 319.

— 1953: Viruskrankes *Epiphyllum*. Öst. Bot. Z. *100*, 348.

— 1953: Kakteen-Virus-Übertragung durch Pfropfung. Protoplasma *43*, 382.

Weber, F., G. Kenda und I. Thaler, 1951: „Stachelkugeln" in *Opuntia*. Phyton *4*, 98.

— — — 1952: Viruskörper in Cacteen-Zellen. Protoplasma *41*, 277.

— — — 1952: Eiweißspindeln und cytoplasmatische Einschlußkörper in *Pereskiopsis*. Protoplasma *42*, 239.

— — 1952: Die Viruskörper von *Opuntia subulata*. Protoplasma *41*, 378.

— — 1951: Cactaceen-Virus-Eiweißspindeln. Protoplasma *41*, 111.

— — 1952: Stomata-Anomalie von *Opuntia*-Virusträgern. Öst. Bot. Z. *100*, 153.

Volle und leere Zellsäfte bei Algen

Von

Karl Höfler und **Hellmuth Schindler**

Mit 4 Textabbildungen

(Eingelangt am 28. März 1955)

I. Einleitung

Die Unterscheidung voller und leerer Zellsäfte war nach dem Verhalten bei Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen getroffen worden (Höfler 1946—1949 b). Mit neutraler oder alkalischer Akridinorangelösung behandelt, nehmen die Vakuolen der vollen Zellsäfte eine grüne, die der leeren eine rote Fluoreszenzfärbung an. Im Tageslichtmikroskop ist die erstere fast unsichtbar, die letztere erscheint gelb. Es wurde gezeigt, daß der Färbemechanismus in beiden Fällen ein völlig verschiedener ist.

In vollen Zellsäften wird die eindringende Farbe an zelleigene Vakuolenstoffe unter Lösungsspeicherung chemisch gebunden. Die leeren Zellsäfte fungieren als „Ionenfallen": Farbbasenmoleküle permeieren im undissoziierten, lipoidlöslichen Zustand aus dem Farbbad durch das Plasma in die Vakuole; sie dissoziieren hier im sauren Zellsaft; so bleibt dauernd ein Gefälle bestehen und neue Moleküle treten ein. Da die Farbionen, lipoidunlöslich und an das wässerige Medium gebunden, nicht durch das Plasma exosmieren können, kommt es zu Ionenspeicherung, die zur sichtbaren Färbung der Zellsäfte führt, wenn sie ein gewisses Maß erreicht hat. Speichernde, die Farbe bindende Stoffe brauchen somit im Zellsaft in diesem Fall nicht zugegen zu sein.

Wie Wiesner (1951) zeigte, kann die Unterscheidung der vollen und leeren Zellsäfte auch mit Hellfeldfarbstoffen getroffen werden. So färbt Neutralrot die ersteren violettrot, die letzteren gelbrot bis erdbeerrot. Die Violettrotfärbung, die vor Lison (1935) als Anzeichen für stärker saure Zellsäfte galt, hat mit der Azidität bzw. Wasserstoffionenkonzentration des Vakuoleninhaltes nichts zu tun, sondern sie bedeutet, daß der Farbstoff in chemische, wohl salzartige Bindung mit zelleigenen Stoffen getreten ist, entsprechend der Grünfluoreszenz mit Akridinorange. Im UV-Licht löschen nach Neutralrotfärbung die leeren Zellsäfte die Fluoreszenz (Strugger 1940 b), während volle Zellsäfte eine, wenn auch schwache, rote Fluoreszenz zeigen (Toth 1952).

Für Brillantcresylblau erscheint nach Wiesner die Färbung der vollen Zellsäfte (von Zwiebelaußenepidermen) grün bzw. blaugrün, entsprechend der Farbtonnummer 16—18 nach Ostwalds Farbtontafel, die Ionenfärbung der leeren Zellsäfte (von Zwiebelinnenepidermen) dagegen intensiv blau (Farbtonnummer 14). Toluidinblau tingiert die leeren Zwiebelzellsäfte blauviolett (13 nach Ostwald), die vollen blaugrün (etwa 19). Bei Nilblau-Chlorhydrat entspricht die blauviolette Ionenfärbung der Farbtonnummer 12, die gelbgrüne bei chemischer Bindung der Nummer 21—22.

Stiegler (1930) findet im Cresylechtviolett einen Farbstoff, der in vollen Säften verschiedener Zellsorten recht verschiedenartige Hellfeldfärbungen und Umfärbungen bei der Nekrose hervorruft und so zur Aufschlüsselung der vollen Zellsäfte (vgl. auch Kiermayer 1953) wird beitragen können.

Die Bezeichnung der Zellsäfte als „voll" oder „leer" ist von mehreren Autoren übernommen worden. Doch sind die Termini der Kritik ausgesetzt. Die Umschreibung „speicherstoffführend" und „speicherstofffrei" für „voll" und „leer" gibt die Begriffe nur unvollständig wieder. Es ist festzuhalten, daß die Bezeichnung „voll" und „leer" sich nur auf die Diffusfärbung der Zellsäfte bezieht. Die vollen enthalten zelleigene Stoffe, die die Farbstoffe chemisch unter diffuser Löslichkeitsspeicherung binden, die leeren sind frei von Speicherstoffen solcher Art. Es können aber z. B. in einer Vakuole, die geringe Mengen von Gerbstoff enthält, unter der Einwirkung eindringender Farbe Krümel ausfallen; dadurch wird ein wenig Farbstoff gebunden, während der Rest frei bleibt und im sauren Milieu Ionenfärbung ergibt; der flüssig verbleibende Zellsaft reagiert jetzt als ein leerer, obwohl anfänglich ein wenig Speicherstoff vorhanden war. Ein Beispiel für solches Verhalten geben Parenchymzellen vieler Compositen (z. B. Salatblätter). Der vitalfärberisch leere Zellsaft war also nicht frei von Speicherstoffen, sondern nur frei von Stoffen, die sich mit der Farbe unter Löslichkeitsspeicherung verbinden.

Wenn Vakuolen Speicherstoffe der letzteren Art in geringer Menge enthalten, so tritt bei schwacher Anfärbung die für „volle" Säfte charakteristische Diffusfärbung ein. Sind dann die Stoffe aufgebraucht, d. h. vollständig gebunden, so erfolgt bei Farbüberschuß weiter Ionenspeicherung. Mit Fluorochromen wie Akridinorange entstehen dabei charakteristische Mischfärbungen. Auf dieser Grundlage hat sich u. a. das „Wundrandphänomen" mit seiner Metachromasie, das bei Vitalfärbung von Gewebsschnitten so häufig begegnet, erklären lassen. — Natürlich können nur dissoziierende basische Farbstoffe, welche Ionenspeicherung ergeben, eine abweichende Färbung der Zellen der stärker speichernden Randzone bewirken, nicht aber z. B. das praktisch elektroneutrale Rhodamin (Höfler 1949 b, S. 51).

Für vergleichende Vitalfärbestudien liefern nun unsere Süßwasseralgen ein vorzügliches Material. Zumal an Hochmooralgen verschiedener systematischer Stellung ist das zytomorphologische Erscheinungsbild der Färbung vergleichend untersucht worden (Cholnoky u. Höfler 1930, Höfler u. Schindler 1931, Loub 1931, Hirn 1933, 1934, Kiermayer 1934).

Unsere eigenen Erfahrungen gründen sich nunmehr auf Beobachtungen und Versuche aus fünf Arbeitssommern. 1949 bis 1952 arbeiteten in der Ramsau bei Schladming Höfler und Schindler, 1954 Höfler allein.

Von vollen und leeren Zellsäften verschiedener Algen war schon mehrfach die Rede; schon Cholnoky und Höfler (l. c. S. 176) hatten den Eindruck, daß bei den Algen vielfach — und relativ öfter als bei Gewebszellen höherer Pflanzen (vgl. Flasch 1955) — leere Zellsäfte vorkommen. Doch blieb diese Annahme weiterer Prüfung vorbehalten. Was an Erfahrungen seither hinzugekommen ist, wird im folgenden darzustellen sein.

Zumal durch Kinzels (1954 b) richtunggebende theoretische Betrachtungen zur Ionenspeicherung basischer Vitalfarbstoffe ist die Aufgabe, leere Zellsäfte an recht verschiedenen Objekten kennenzulernen, aktuell geworden. Für die leeren Zellsäfte wird sich das alte Arbeitsziel, die pH-Werte in vivo mit Hilfe der Vitalfärbung zu messen (vgl. Küster 1926/27, Strugger 1941), auf Grund der Betrachtungen Kinzels wohl in absehbarer Zeit erreichen lassen. Vergleichende Bestimmungen in cH-gestuften Farbbadreihen, bezogen auf die Dissoziationskonstante[1] der verwendeten Farbstoffe, wird auch die Pufferung von leeren Zellsäften erstmalig schätzen oder messen lassen.

II. Unterscheidung leerer und voller Zellsäfte

Als wichtigste Mittel zur Unterscheidung können gelten:

1. Die Erscheinungen der Metachromasie,
2. die NH_3-Reaktion,
3. parallele Färbung mit Rhodamin B und dissoziierenden basischen Farbstoffen,
4. die Lage der Färbeschwellen in pH-gestuften Farbbadreihen,
5. die Allgemeinkontraktion der Vakuolen.

1. Von den Erscheinungen der Metachromasie war schon eingangs die Rede. Neutralrot und Toluidinblau färben leere und volle Algenzellsäfte im allgemeinen in gleicher Weise verschieden wie leere und volle Säfte von Gewebezellen höherer Pflanzen. — Beim Brillantcresylblau scheinen die Verhältnisse komplizierter zu liegen. Wie zu zeigen sein wird, färben sich leere Zellsäfte meist violett, mehrfach aber auch kobaltblau, während himmelblaue Vakuolenfärbung für volle Zellsäfte spricht.

Das Akridinorange verleiht, wie allbekannt, leeren Zellsäften eine gleißend kupferrote[2] (Strugger 1940 a), vollen eine grüne Fluoreszenzfärbung (Höfler 1946 f.). Handelt es sich um die Untersuchung von Algen, so stört freilich bei der Beobachtung im UV-Licht die rote Eigenfluoreszenz der Plastiden. Beobachtet man aber akridinorangegefärbte Zellen im Tages-

[1] Einem brieflichen Hinweis von Herrn Koll. Collander verdanken wir mehrere Werte für Dissoziationskonstanten von Farbstoffen. Diese betragen z. B. für

Neutralrot	$K_B = 10^{-6,6}$	
Brillantcresylblau	ca. $10^{-5,6}$	nach Irwin, J. gen. Physiol. (Am.) *14*, 1930, 1.
Thionin	$1{,}88 \times 10^{-3}$	nach M. Brooks, Amer. J. Physiol. *90*, 1929, 300.

[2] Von Zanker (1952 a, b, unter Günther Scheibe) wurde nachgewiesen, was früher nur vermutet worden war, daß es sich dabei um reversible Polymerisation der Kationen des Akridinorange handelt.

licht, so erscheinen die durch Ionenspeicherung gefärbten Zellsäfte typisch sattgelb. Danach sind leere Zellsäfte auch ohne Gebrauch des UV-Mikroskops gut zu erkennen, wenn man ferne vom Laboratorium arbeitet. Als Objekt zur Einübung sei *Oedogonium* empfohlen.

2. Vor allem hat sich aber die NH_3-Reaktion (Höfler 1947 f., 1948, S. 622—633, Wiesner 1931) zur Unterscheidung bewährt.

Behandelt man leere Zellsäfte, die durch Ionenspeicherung gefärbt worden sind, mit verdünnter Ammoniaklösung ($n/200$ NH_3), die durch das lebende Plasma leicht permeiert, so werden die vordem sauren Zellsäfte alkalisch und die eingefangenen Ionen wandeln sich wieder zu permeierfähigen Molekülen. Diese exosmieren rapid, die Zellsäfte entfärben sich, ohne daß die Zellen getötet werden, wie folgende Zuckerplasmolyse zeigt. — Volle Zellsäfte werden durch NH_3 nicht entfärbt, höchstens in manchen Fällen (Neutralrot!) reversibel gebleicht.

Abb. 1. *Closterium lineatum*, entfärbt sich, wenn NH_3 durch das Präparat strömt.

Wir haben die NH_3-Probe im Sommer 1932 erstmalig auf vitalgefärbte Algen angewandt.

Closterium lineatum Ehrbg. gibt, wie in unserer letzten Arbeit (1933, S. 299, Abb. 2) beschrieben, mit alkalischer Brillantcresylblaulösung eine prächtige Diffusfärbung der Zellsäfte mit nachheriger Vakuolenteilung und -kontraktion. Wir wählten Zellen, die mit einem Pol im Detritus steckten und darin so festgehalten wurden, daß sie der Länge nach frei vorragten (Abb. 1). Die Präparate wurden mit Brillantcresylblau (1280 der Fa. Merck), pH 8,3—10,7, 10 Min. behandelt, dann durch Durchspülen des gleichnamigen Puffers ausgewaschen. Die Zellsäfte waren diffus blau gefärbt. Nun saugte der eine von uns $n/200$ NH_3-Lösung durch das Präparat, während der andere gleichzeitig mikroskopisch beobachtete: In wenigen Sekunden entfärbten sich die Vakuolen, während die Zellen am Leben blieben.

Sehr anschaulich ließ sich der Versuch mit *Oedogonium* durchführen. Wir verwendeten eine 20 μ breite, mit längsverlaufenden Plastidenbändern ausgestattete und durch dicke Pyrenoide gekennzeichnete Art aus dem „quadratischen Wasserloch" des Ramsauer Torfmoors (vgl. 1933, S. 296); die Alge war seit Jahren an diesem Standort gesammelt worden und hatte zu verschiedenen zellphysiologischen Versuchen (z. B. Höfler 1931, S. 449) gedient. Stückchen der Algenwatten wurden mit Brillantcresylblau 1 : 10.000, pH 8,3 10 Min. lang gefärbt. Alle lebenden Fäden nahmen eine kobaltblaue Vakuolenfärbung an. Nun wurde mit $m/150$ Puffer, pH 8,3, gut ausgewaschen und nach einiger Zeit $n/100$ NH_3 durchgesaugt. Schon bei schwacher Vergrößerung war die Entfärbung der Zellsäfte gut zu beobachten. Die durch

das Plasma ausgetretene Farbe wurde z. T. in den Zellwänden sichtbar festgehalten — ähnlich wie dies für akridinorangegefärbte *Allium*-Zellen seinerzeit (Höfler 1948, S. 624) beschrieben worden ist. Bei unserem *Oedogonium* erscheinen im Protoplasten kleine blutrote Tröpfchen. Nach 2½ Min. wurde eine Traubenzuckerlösung von 0,6 mol, die auf etwa pH 8,3 gepuffert[3] war, durchgesaugt; es gelang, die früher beobachteten Zellen an der Lage der blutroten Tröpfchen wiederzuerkennen und den Eintritt der Plasmolyse in ihnen festzustellen.

An einem gleichen, mit 1 : 5000 Brillantcresylblau vorgefärbten Präparat beobachteten wir bei starker Vergrößerung, wie sich beim Zutritt von *n*/100 NH_3 die Zellsäfte entfärbten und die für unser *Oedogonium* kenn-

Abb. 2. *Oedogonium*, mit Brillantcresylblau gefärbt, mit *n*/100 NH_3 entfärbt, dann mit auf pH 8,3 gepufferter Traubenzuckerlösung plasmolysiert; Zelle links zeigt normale Plasmolyse, Zelle rechts Tonoplastenstadium.

zeichnenden roten Kügelchen ausfielen. Beim Durchsaugen der gepufferten Zuckerlösung waren die Zellen zum Teil nicht mehr normal plasmolysierbar. An anderen Stellen des Präparats erfolgte Plasmolyse und ein Teil der Protoplasten zeigte nun schönen violetten Zellsaft: ein Teil der Farbe war also aus den Membranen in den Zellsaft zurückgekehrt (wie früher für *Allium* beschrieben). Manche Zellen zeigten nur ganz mattblaue Zellsäfte; stärkere Vergrößerung ließ aber erkennen (Abb. 2), daß nur die violetten Zellen normal plasmolysiert waren, die mattblauen aber nur mehr Tonoplasten enthielten, an denen außen tote Plasmareste und die toten, tiefblau gefärbten Zellkerne aufsaßen. In anderen Fäden gab es durchwegs normale Plasmolyse mit konvexer Rundung und Plasmolysegraden von z. B. $G = 0{,}56$.

Damit erscheint wohl bewiesen, daß das geprüfte *Oedogonium* leere Zellsäfte hat, die sich nach dem Ionenfallenmechanismus färben. Gleiches gilt für mehrere andere artverschiedene Oedogonien. Im Juni 1954 wurde im Wiener Institut ein aus den Donauauen von Dr. R. Jarosch eingebrachtes Oedogonienmaterial mit Akridinorange behandelt; die Beobachtung der Rotfluoreszenz im UV-Mikroskop wird bei chlorophyllreichen Algen durch die rote Eigenfluoreszenz der Plastiden erschwert; aber die gesättigt gelbe Farbe der Vakuolen der lebenden Zellen im Tageslichtmikroskop ließ keinen Zweifel, daß Ionenspeicherung leerer Zellsäfte vorlag.

Da die NH_3-Lösung von *n*/100 mol die Plasmen bei vollem Zutritt schädigt, wurde bei der ausführlichen Wiederholung der Ammoniakversuche im Sommer 1954 meist die unschädlichere Konzentration von *n*/200 angewandt. Die aus den Ramsauer Torfmooren eingebrachten Algenproben wurden in offenen Tropfen gefärbt, sodann wurde das von Splittern gestützte Deckglas aufgelegt, wodurch das rasch aufeinanderfolgende Durchspülen des

[3] Bereitet aus 5 Teilen 1,20 mol Traubenzucker, 4 Teilen H_2O und 1 Teil *m*/15 Phosphatpuffer pH 8,3.

Puffers, der NH_3-Lösung und der plasmolysierenden Zuckerlösung erleichtert wird. Auch einzellige Algen gehen nicht verloren, wenn sie in Mischproben durch Fadenalgen gestützt sind.

Sehr anschaulich verliefen Versuche, worin die Algen mit frisch hergestellter Neutralrotlösung 1 : 5000, pH 8,3 vorgefärbt waren. Bei den meisten Desmidiaceen der artenreichen Mischproben aus dem Ramsauer Schwaigermoos (RMK) verschwand die erdbeerrote Diffusfärbung beim Zutritt des NH_3 sogleich. Nachher wurde Traubenzuckerlösung (die hier nicht gepuffert zu sein braucht) durchgesaugt und der Eintritt normaler Plasmolyse festgestellt. Der Nachweis leerer Zellsäfte und auf Ionenspeicherung beruhender Vitalfärbung gelang u. a. an folgenden Arten: *Closterium Dianae, Xanthidium armatum, Xanthidium antilopaeum, Arthrodesmus incus, Staurastrum furcatum, Hyalotheca dissiliens, Mougeotia* sp. (S.), *Tribonema viride.* Das letztere entfärbt sich bis auf die rot verbleibenden Körnchen (vgl. S. 183), *Mougeotia* bis auf die die Farbe festhaltenden Physoden.

Für die Mehrzahl der Ramsauer Versuche wurde Brillantcresylblaulösung, die auf pH 8,3 gepuffert war, verwendet. Der Farbton war hier nicht gleichmäßig. Die Erscheinungen der Metachromasie bleiben für diesen Farbstoff noch zu klären, sie lassen sich nicht wie beim Akridinorange wesentlich auf volle oder leere Zellsäfte zurückführen. Bei den beschriebenen Versuchen vom Sommer 1952 war das gleiche Mercksche Präparat Brillantcresylblau 1280 verwendet worden, das für die Färbeversuche mit Closterien (H ö f l e r und S c h i n d l e r 1953, S. 297) gedient hatte; der die Membranen kräftig tingierende Farbstoff bewirkt kobaltblaue Vakuolenfärbung, scheint aber die Zellen etwas stärker zu schädigen. Im Sommer 1954 verwendete ich eine frische Packung von Grübler, die sich als unschädlicher erwies. Frisch bereitete Lösungen der Pufferreihe zeigten bei pH 3,1—10,7 blaue Farbe (Farbtönung entspricht pa 14 der Ostwaldschen Farbtontafel) und bei pH 11,2—11,7 violette Farbe (entspricht pa 11). Wir vermeiden es in diesem Fall, von ortho- oder metachromatischer Färbung der Zellsäfte zu sprechen.

Mit der Grüblerschen Farbprobe ergab sich meist eine violette Vakuolenfärbung, u. zw. im ganzen pH-Bereich, wo Ionenspeicherung überhaupt zustande kam. Nur ausnahmsweise fand sich statt dessen eine dunkelblaue Färbung, so bei *Arthrodesmus incus* und *Cosmarium alpinum* nach 10 Min. Färbung und 40 Min. Verweilen im Puffer pH 8,3. Starke Vakuolenkontraktion trat häufig ein. Orientierend beobachtete ich einmal bei einem Parallelversuch mit Merckschem und Grüblerschem Brillantcresylblau (pH 11,2) im ersteren Farbstoff blaue (Ostwald pa 13), im letzteren violette Färbung. Manchmal wurden im selben, mit Grüblerschem Farbstoff behandelten Präparat (bei pH 11,2) die meisten Zellsäfte von *Arthrodesmus incus* violett, einzelne aber blau gefärbt.

Die Violettfärbung der Zellsäfte, die dem Farbton 12 der Ostwaldschen Farbskala entspricht, erweist sich (von wenigen noch aufzuklärenden Ausnahmen abgesehen) als auswaschbar mit $n/200$ NH_3 und kann als Ionenfärbung leerer Zellsäfte gelten.

3. In einer früheren Arbeit (Höfler 1949 b) ist vorgeschlagen worden, zu Zwecken der Kausalanalyse von Vitalfärbeeffekten die Zellobjekte jeweils gleichlaufend mit zwei basischen Fluoreszenzfarbstoffen physikalisch verschiedener Natur zu behandeln. Damals wurde Akridinorange und Rhodamin B verwendet. Dieser letztere Farbstoff ist bekanntlich entsprechend seiner niederen Dissoziationskonstante so schwach dissoziiert, daß er praktisch im ganzen physiologischen pH-Bereich von pH 2—11 als elektroneutral gelten kann (Drawert 1937, 1939) und ist dabei der unschädlichste von allen basischen Vitalfarbstoffen (Strugger 1937, 1939, S. 183, Johannes 1941). Elektroadsorptive Zellwandfärbung ist unmöglich, wie seit Ruhland (1908) bekannt. Aber auch Ionenfärbung von Zellsäften ist natürlich ausgeschlossen. Wo also Rhodamin B eine Diffusfärbung von Zellsäften bewirkt (auf die sehr oft Ausfällung von Entmischungskugeln folgt), da muß es sich um chemische Bindung des Rhodamins mit zelleigenen Vakuolenstoffen handeln und es müssen volle Zellsäfte vorliegen.

Wir haben im September 1952 eine größere Versuchsreihe unternommen, worin gleiche Algenproben in Parallelversuchen einerseits in Rhodamin B (1 : 1000 bis 1 : 2000, in H_2O gelöst), anderseits in Brillantcresylblau (ph 8,3, 1 : 10.000 und 1 : 5000) angefärbt wurden. In der folgenden Tabelle sind einige Ergebnisse zusammengefaßt.

Viele Algen, für die die NH_3-Probe leere Zellsäfte und Vitalfärbung nach dem Ionenfallenmechanismus nachweist, färben sich auch in dieser Versuchsreihe diffus blau mit Brillantcresylblau und bleiben ungefärbt mit Rhodamin. Führt man den Rhodaminversuch mit artenreichem, an Detritus armem Mischmaterial durch, so fallen stets einige Algenarten durch spezifische Elektivfärbung auf. *Netrium digitus* zeigt stets die Zellsäfte stark gefärbt. Der Farbton ist Karminrosa (dazu sind die Plastiden nach Olivenbraun verfärbt). Im Brillantcresylblau färbt sich der Zellsaft intensiv blaugrün, also metachromatisch gegenüber der kobaltblauen oder violetten Färbung der meisten anderen Algen. In Neutralrot färbt sich die Vakuole lilarot. Beim Durchsaugen von NH_3 tritt bei *Netrium* keine Entfärbung ein. Bei Wiederholung der Versuche im Wiener Institut wurde die Rhodaminfärbung auch im Fluoreszenzmikroskop überprüft: die Zellsäfte leuchten im UV-Licht typisch goldbraun. *Netrium digitus* zeigt also ausnahmslos vollen Zellsaft. Daß auch oft reichlich Entmischungstropfen ausfallen, ist bekannt[4]. *Netrium oblongum* verhält sich ähnlich, nur scheint der Gehalt

[4] Die bei Höfler und Schindler 1951, S. 145 und 148, als *Netrium oblongum* bezeichnete Alge ist in Wahrheit *Netrium digitus* var. *parvum* Borge (vgl. Krieger 1933, S. 216). Seit 1951 haben wir vielfach mit echtem *Netrium oblongum* aus Krimml (Höfler u. Loub 1952) und aus sauren Schlenken des Ramsauer Schwaigermooses (RMK) gearbeitet. *Netrium digitus* var. *parvum*, die im RMK in der algenreichen Biocönose des „Hauptgrabens" bei pH 6,5 vorkommt, verhält sich vitalfärberisch wie gewöhnliches *Netrium digitus*. Diese hoch- und eigenartig organisierte Alge (vgl. Kopetzky-Rechtperg 1938, 1955) ist durch den reichen Gehalt an einem Speicherstoff, der wohl nicht Gerbstoff ist, im Zellsaft ausgezeichnet, dazu durch ein ausnehmend lebhaftes Speichervermögen der Plastiden für Rhodamin B.

Zellsaftfärbung mit

	Rhodamin B	Brillantcresylblau pH 8,3 1:5000 und 1:10.000	Zellsaft
Mesotaenium macrococcum	ungefärbt	himmelblau, durch NH_3 nicht entfärbt	voll?
Spirotaenia condensata	ungefärbt	kobaltblau, entfärbt mit NH_3, rote Kügelchen entstehen	leer
Cylindrocystis Brebissonii	blauviolett		voll
Netrium digitus	karminrosa	blaugrün mit Entmischungskugeln, NH_3 entfärbt nicht	voll
Closterium navicula	ungefärbt	kobaltblau	leer
Closterium libellula	ungef., Endbläschen rosa	blau	
Closterium Dianae	lachsrot?	blau, mit Vakuolenkontraktion	leer?
Closterium gracile	ungefärbt	blau	leer
Closterium juncidum	ungefärbt	ungefärbt	
Closterium striolatum	ungefärbt	ungefärbt, keine Ionenspeicherung	
Pleurotaenium Ehrenbergii	ungefärbt	blau	leer
Pleurotaenium rectum	ungefärbt	blau	leer
Tetmemorus granulatus	ungefärbt	blau	leer
Tetmemorus laevis	ungefärbt	blau	leer
Euastrum oblongum	ungefärbt		
Micrasterias truncata	ungefärbt	kobaltblau, entfärbt mit NH_3	leer
Micrasterias pinnatifida	ungefärbt	kobaltblau	leer
Cosmarium contractum var. ellipsoidea	ungefärbt	blau	leer
Xanthidium armatum	ungefärbt	blau	leer
Xanthidium antilopaeum	ungefärbt	blau	leer
Arthrodesmus incus	ungefärbt	blau	leer
Staurastrum gracile	ungefärbt	blau	leer
Staurastrum Heimerlianum	ungefärbt	blau	leer
Staurastrum teliferum	ungefärbt	blau	leer
Hyalotheca dissiliens	ungefärbt	„himmelblau" (?) kobaltblau	?
Gymnozyga Brebissonii	ungefärbt	kobaltblau, NH_3 entfärbt	leer
Eremosphaera viridis	ungefärbt	zart blau	leer
Oedogonium RT	ungefärbt	blau	leer
Chlorobotrys regularis	ungefärbt	ungefärbt!	

Läßt man die Algen unter Deckglas in der feuchten Kammer liegen, so verbleicht die Färbung innerhalb der lebenden Zellen. Kiermayers (1933) Untersuchungen zeigen, daß es sich dabei um Redox-Phänomene, um Bildung von Leukobasen bei O-Mangel handeln dürfte.

an Speicherstoffen von Material zu Material starken quantitativen Schwankungen zu unterliegen. — Parallelversuche mit Rhodamin B und Neutralrot lieferten stets analoge Ergebnisse. Der *Netrium*-Zellsaft färbt sich mit Neutralrot violettrot.

Cylindrocystis Brebissonii fällt in den mit Rhodamin gefärbten Algenwatten durch die tief blauviolette Färbung der Kopetzkyschen Kügelchen in den Mischproben stark auf (vgl. schon Höfler u. Schindler 1951, S. 147, Abb. 3); der Farbton ist etwa 12 (nach Ostwald).

Vielbändrige Spirogyren zeigten nach Rhodaminbehandlung mehrfach schöne und starke Diffusfärbung der Zellsäfte, die im Tageslicht-Mikroskop violett, im UV-Licht aber goldbraun erschien. Andere Spirogyren ließen bloß die bekannte Krümelbildung im Zellsaft, dazu Körnchenanfärbung im Plasma eintreten. Allen bisher geprüften Spirogyren sind volle Zellsäfte zuzusprechen.

Als Beispiel ein Ramsauer Versuch. Am 24. September 1952 wurde eine frisch eingebrachte einbändrige *Spirogyra* 2 Minuten lang in Rhodamin B 1 : 1000, gelöst im leicht alkalischen Standortswasser, zu schön diffus rosa Zellsaftfärbung angefärbt. Die Rhodaminfärbung tritt rasch ein, viel rascher als die Ionenfärbung in leeren Zellsäften. Es wurde dann mit reinem Standortswasser ausgewaschen und nach 9 Min. *n*/100 NH_3 durch das Präparat gesaugt. Entfärbung trat nicht ein. Nach 2 Min. wurde H_2O durchgesaugt; nun zeigte sich ein feinkörniger rosa Niederschlag in den Zellsäften. Nach 7 Min. in 0,8 mol Traubenzucker übertragen, ließ die *Spirogyra* langsam eine normale Plasmolyse eintreten. Im Kontrollmaterial, das gefärbt, aber nicht mit NH_3 behandelt war, war nach 3 Tagen unvermindert starke diffus rosa Vakuolenfärbung erhalten. In Parallelversuchen mit Brillantcresylblau entfärbte 1/100 NH_3 die Zellsäfte nicht.

Auf Fluorochromfärbungen, die im Wiener Institut durchgeführt und im Farbphoto festgehalten wurden, wird anderwärts noch zurückzukommen sein.

Arten der Gattung *Mougeotia* wurden oftmals in Mischwatten geprüft, sie zeigen mit Rhodamin B zwar die als Physoden bekannten Gerbstofforganellen gefärbt, die Zellsäfte bleiben aber ungefärbt. Sie färben sich auch nicht mit Neutralrot und Brillantcresylblau. *Mougeotia* hat leere Zellsäfte. Arbeitet man im Laboratorium, so kann man die Conjugaten mit Vorteil vor der Färbung mäßig stark zentrifugieren, so daß ein Teil des Zell-Lumens von Plastiden freigelegt wird. Solches Material läßt sich dann auch im UV-Licht gut untersuchen: Akridinorange wird rot gespeichert, die Zellsaftfärbung erfolgt also nach dem Ionenfallenmechanismus. Rhodamin B tingiert die Physoden, läßt aber die Zellsäfte ungefärbt [5].

Auch die Zellsäfte von *Zygnema* erscheinen leer. Wenigstens ließen sich sowohl an zentrifugiertem als auch an intaktem Material Fälle leeren Zellsaftes klar nachweisen. Dies überrascht, da das starke Speichervermögen der Gattung seit Pfeffers (1886) klassischer Arbeit bekannt ist. Die Untersuchung der Zygnemen wird allerdings erschwert durch das starke Speichervermögen der Gerbstoffbläschen, die vielfach ganz ungewöhnlich starke Speicherung der Zellmembranen und die daraus resultierende Speicherkonkurrenz (vgl. Höfler u. Schindler 1951, S. 147). Wir gehen daher auf unsere Versuche mit Zygnemen jetzt nicht näher ein.

4. Über die Färbeschwellen in pH-gestuften Farbbadreihen liegt aus den Arbeiten von Höfler und Schindler (1951) und Hirn (1953)

[5] Gewisse Ausnahmsfälle, wo Rhodamin doch diffus zu färben scheint, bleiben aufzuklären.

schon einiges Beobachtungsmaterial vor. In Toluidinblau, auf das sich die Mehrzahl der dort mitgeteilten Versuche bezieht, reicht die diffuse Vakuolenfärbung der Desmidiaceen und von *Eremosphaera* von der alkalischen Seite nur bis zu einer Pufferung aus 3 Tl. $KH_2PO_4 + 7$ Tl. Na_3PO_4 oder 4 Tl. $KH_2PO_4 + 6$ Tl. Na_3PO_4, was nach Kinzels (1954a) neuen Messungen pH-Werten von $11{,}0 \pm 0{,}1$ bzw. $10{,}5 \pm 0{,}1$ entspricht. Für Neutralrot und Brillantcresylblau liegen nach Hirn (1953, S. 433) die Grenzen der Dissoziationskonstanten dieser Farbstoffe entsprechend tiefer, aber die relative Lage für die einzelnen Spezies entspricht den mit Toluidinblau gewonnenen Werten.

Brillantcresylblau (Grübler), 1 : 5000.

Färbezeit 12—15 Min., dann im gleichnamigen Puffer beobachtet.
I = KH_2PO_4, III = Na_3PO_4.
(Membran- und Gallertfärbung nicht berücksichtigt.)

HCl	I	III	Farbe 1:1000	H_2O	pH	*Closterium Dianae*	*Cosmarium contractum* var. *ellipsoideum*	*Arthrodesmus incus*	Andere Desmidiaceen	*Netrium digitus* var. *parvum*	*Netrium oblongum*
1	9		20	70	**3,1**	—	—	—	—	—	—
0,1	9,9		20	70	**4,1**	—	—	—	—	—	—
	10		20	70	**4,8**	—	—	—	—	+ blaugrün	+*) / (—)
	8	2	20	70	**6,8**	—	—	—	—	+	+
	7	3	20	70	**7,1**	—	—	—	—	+	+
	6	4	20	70	**7,5**	— — / +	— —	— — / +	— — / (+)	+ blaugrün na 17—18	+
	5	5	20	70	**8,3**	+	+	+	+ pa 13—14	+	+
	4	6	20	70	**10,7**	+	+ pa 13	+	+	+ +	+ +
	3	7	20	70	**11,2**	+ +	+	+	+	+ +	+ +
	2	8	20	70	um **11,6**	+ +	+	+	+	+ +	+ +

*) Diffusfärbung und Entmischungskugeln von pH 4,8 aufwärts.

Wir haben pH-gestufte Reihenversuche mit Brillantcresylblau in großer Zahl ausgeführt. Wir geben in Tabellenform eine Versuchsreihe vom

31. August 1934 wieder, die in der Ramsau mit optimalem, am Vortag gesammeltem Algenmaterial und mit exakt hergestellten Lösungen vorgenommen wurde.

Wie Hirn (1933, S. 469) feststellte, tritt Zellsaftfärbung nicht ein bei denjenigen *Cosmarium*-Arten, bei welchen rasch blaue Körnchen im Plasma sichtbar werden (*C. cucurbita, pyramidatum, globosum, palangula* u. a.). Bei *Micrasterias rotata* und manchen anderen Arten fallen nach Vitalfärbung mit Brillantcresylblau kleine himmelblaue Körnchen aus, die im Zellsaft gelegenen zeigen lebhafte BMB.

Für die meisten Desmidiaceen, denen nach den früheren Feststellungen leere Zellsäfte zuzusprechen sind, liegt in Brillantcresylblau die Grenze der Diffusfärbung und Farbspeicherung nach dem Ionenfallenmechanismus bei pH 8,3. Bei pH 7,5 sind bei vielen Arten alle Zellen ungefärbt, bei manchen Arten einige Zellen gefärbt. Bei pH 7,1 tritt im Reihenversuch nirgends mehr eine Färbung leerer Vakuolen an intakten Zellen auf [6].

Netrium digitus mit seinen vollen Zellsäften verhielt sich in den Mischproben wieder auffällig verschieden; die diffuse Zellsaftfärbung reicht hier bis weit in den sauren Bereich, nämlich bis pH 4,8. Überall bis zu dieser pH-Stufe finden sich auch ausgefällte Entmischungskugeln. — Eine *Mougeotia* zeigt im alkalischen Bereich die für leeren Zellsaft typische violette Färbung, während die Physodenfärbung herab bis auf pH 4,8, mitunter noch tiefer reicht.

Durchwegs bestätigt sich, daß auch bei Algen die Färbeschwellen für leere Zellsäfte hoch, für volle Zellsäfte tief in der pH-Skala liegen.

Am auffälligsten ist die Lage der Schwellen bei *Tribonema*. Sie liegen hier in denselben Zellen verschieden für die Färbung der Vakuolen und der speichernden Inhaltskörperchen. Wir arbeiteten mit mehreren Arten, am besten eignete sich für die Versuche das im Moor RT häufige, gut bestimmbare *Tribonema viride* Pascher (vgl. 1925, S. 506): die Zellsäfte sind leer und färben sich von der alkalischen Seite bis auf pH 8,3. In jeder Zelle liegen 1 (—2) grobe, stark lichtbrechende Körnchen chemisch unbekannter Natur, die in der systematischen Literatur als anscheinend konstante Bildungen bei *Tribonema* erwähnt werden und, wo vorhanden, die Gattung auf den ersten Blick erkennen lassen. Diese Körnchen sind durch ein besonders starkes Farbspeichervermögen ausgezeichnet. Schon P. A. Dangeard (1916) hat für *Tribonema bombycinum* nachgewiesen, daß ein Eintauchen der Fäden in das Farbbad für 2 Sekunden zur Anfärbung genügt. Mit alkalischem Brillantcresylblau färben sich die Körnchen himmel-

[6] Bei manchen Arten, zumal bei *Closterium Dianae*, welches im Auftrieb oft im Spätsommer zur Dominanz gelangt, zeigten in schwach sauren Farbbädern im Übersichtsbild manche Zellen Vakuolenfärbung. Genauere Beobachtung und Plasmolysierung mit Traubenzucker ergab aber, daß es sich um nekrotische Zellen im Tonoplastenstadium handelte. Wie bei Lebermoosen und *Allium*-Zellen (Höfler 1952) können auch bei Desmidiaceen durch die freigelegte Tonoplastenmembran Farbionen permeieren und in den Vakuolen an Speicherstoffe (die dahin etwa sekundär aus dem absterbenden Plasma gelangen) gebunden werden.

blau, der Zellsaft in denselben Zellen violett. Die Körnchenfärbung reicht bis pH 4,1 und darunter. Es beweist dies, daß so weit nach der sauren Seite noch permeierfähige Moleküle vorhanden sind. Daß Farbkationen nicht permeieren, wird wie überall durch das Fehlen der Anfärbung unterhalb einer im vital-sauren Bereich gelegenen Schwelle, wo der Farbstoff zur Gänze dissoziiert ist, bewiesen. Niemals kann ja Inhaltsfärbung an intakten Zellen durch Ionenpermeation erklärt werden (Höfler 1949 a, b, Pecksieder 1950).

Tribonema viride in Brillantcresylblau.

pH	Körnchen	Zellsaft	Zellwände
3,1	—	—	+ + blauviolett
4,1	+ blau	—	+ + blauviolett
4,8	+ + blau	—	+ + blauviolett
6,8	+ + blau	—!	+ + blauviolett
7,1	+ + blau	—!	+ + blauviolett
7,5	+ + blau	—!	+ (+) blauviolett
8,3	+ + blau	+ violett la 10—11	+ blauviolett
10,7	+ + blau	+ violett	+ blauviolett
11,2 um 11,6	+ + blau	++ violett + violett	— —

Die Spanne zwischen beiden Färbeschwellen, hier an Komponenten derselben Protoplasten ermittelt, beträgt vier Größenordnungen der Wasserstoffionenkonzentration. —

Auf unsere Reihenversuche mit anderen basischen Farbstoffen soll nur kurz eingegangen werden.

Einer der dankbarsten Farbstoffe für vitale Zellwandfärbung ist das Thionin. Die (Basen-) Dissoziationskonstante dieses Farbstoffes ist groß, der Umschlagsbereich von der Zellwand- zur Zellinhaltfärbung wird entsprechend hoch liegen.

Wir verwendeten vor allem alkalisch gepufferte Farbbäder von 3 Tl. KH_2PO_4 + 7 Tl. Na_3PO_4 (pH um 11,1) und 8 Tl. KH_2PO_4 + 2 Tl. Na_3PO_4 (pH wohl um 11,3) und beobachteten wie immer im gleichnamigen ungefärbten Puffer. Gut speichernde Inhaltskörper färben sich in der lebenden Zelle: so die Physoden von *Mougeotia* und die Körnchen von *Tribonema*; auch in einzelnen vollen Zellsäften wurde Speicherung erzielt. Zu einer Anfärbung leerer Zellsäfte kam es aber nicht. Im alkalischen Thioninfarbbad ist also Permeation der Farbmoleküle durch das Plasma nachweisbar, wir fanden aber keine Farbionenspeicherung im Zellsaft. Wir versuchten auch noch, Thionin, in reinem tertiärem Phosphat ($n/150$ Na_3PO_4) gelöst, anzuwenden. Hier färbten sich die *Tribonema*-Körnchen tief violett (pc 7

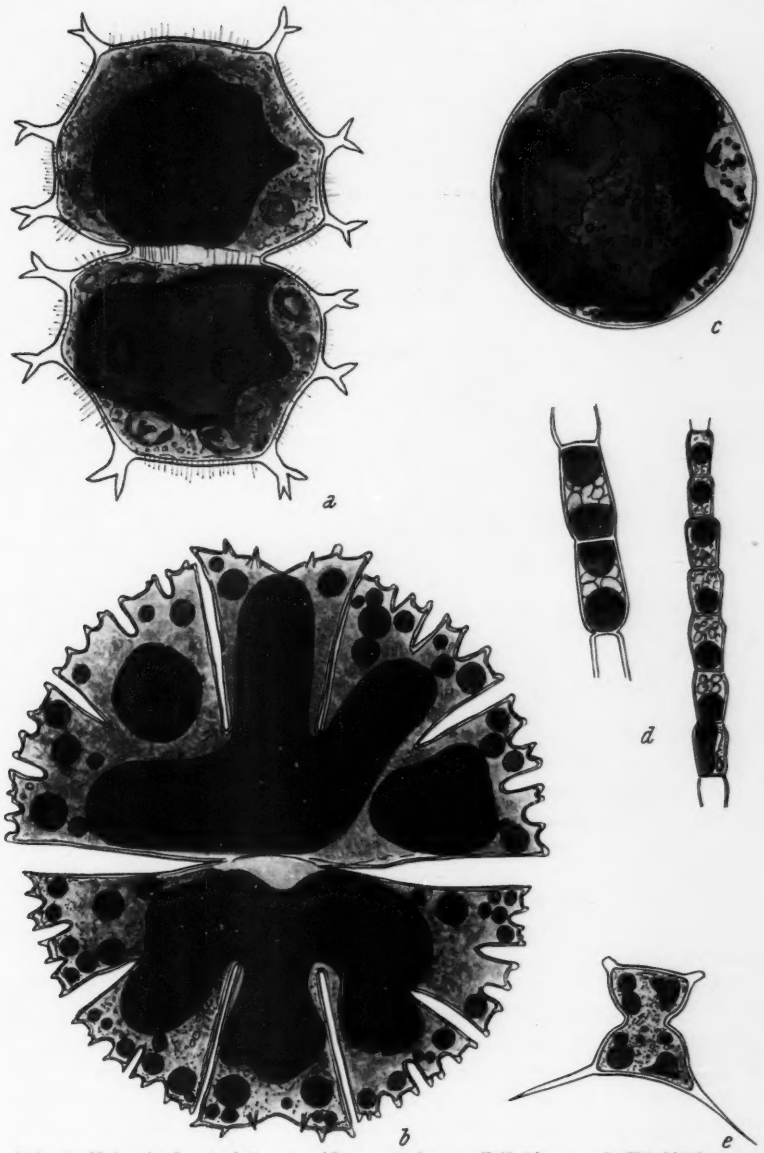


Abb. 3. Vakuolenkontraktion in Algen mit leeren Zellsäften nach Vitalfärbung — mit Neutralrot 1 : 10.000, pH 8,3: *a Xanthidium armatum*, *e Arthrodesmus incus*, 1 : 3000, *d Oedogonium* sp. — mit Brillantcresylblau 1 : 10.000, pH 10,1: *b Micrasterias fimbriata* (15 Min. gefärbt, 30 Min. im Puffer) 1 : 3000, *c Eremosphaera viridis* (15 Min. gefärbt, dann 22 Stunden im Puffer). — Versuche vom 4. März 1933.

nach Ostwald), die *Mougeotia*-Physoden schwarzviolett. Selbst hier gab es aber in leeren Zellsäften keinerlei Diffusfärbung.

Auch in pH-gestuften Farbbadreihen von Bismarckbraun (Vesuvin) ließ sich an unseren Objekten nur Färbung von Inhaltskörpern und Diffusfärbung der vollen Zellsäfte, aber auffälligerweise bisher keine Ionenfärbung leerer Zellsäfte feststellen, — während für leere Zellsäfte der Zwiebelinnenepidermen doch im Schrifttum Diffusfärbung mehrfach angegeben wird (Drawert 1940, Scheidl 1955).

5. Vakuolenkontraktion tritt bei Algen mit leeren Zellsäften nach Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen ganz allgemein auf (Cholnoky u. Höfler 1950, Höfler u. Schindler 1951, 1953, Hirn 1953). Wir können uns kürzer fassen, da die Erscheinung jüngst von Kiermayer eingehend behandelt worden ist. Abb. 3 *b* zeigt Kontraktion nach Brillantcresylblaufärbung (pH 10,1) bei *Micrasterias fimbriata*, Abb. 3 *c* schwache und später eintretende Kontraktion bei *Eremosphaera viridis*, Abb. 3 *d* solche, die in allen Zellen starke und gleichmäßige Grade erreicht, bei Oedogonien. Bei leeren, ionenspeichernden Zellsäften kann Vakuolenkontraktion grundsätzlich wohl überall eintreten, doch bleibt sie beim Gebrauch schädigender Farbstoffe vielfach aus. Schon bei Färbung mit Merckschem Brillantcresylblau wurde sie vielfach vermißt an Objekten, welche Kontraktion mit Neutralrot und großenteils auch mit Grüblerschem Brillantcresylblau ergaben.

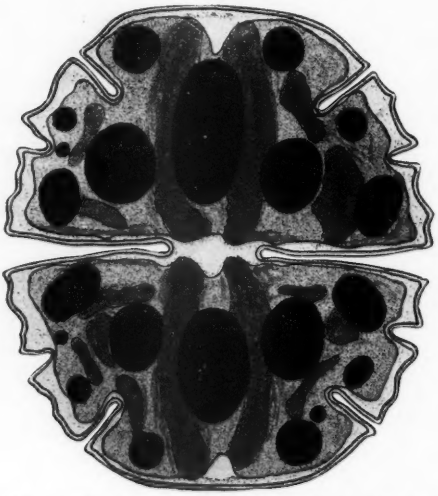


Abb. 4. *Micrasterias truncata*. Vakuolenkontraktion nach Neutralrotfärbung. Nach Kiermayer 1954, S. 186.

Die vitale Kontraktion und folgende Vakuolenzerschnürung bei den Desmidiaceen ist übrigens ein recht eigenartiges Phänomen. Während bei vitalgefärbter *Elodea* (Weber 1930) und anderen Gewebszellen bei Allgemeinkontraktionen das aufquellende Plasma den Raum zwischen Zellwand und Tonoplast zur Gänze erfüllt, scheint sich bei den Desmidiaceen — recht klar z. B. bei *Tetmemorus granulatus* — die Vakuolenwandung vom Plasmawandbelag zu lösen, so daß dann farblose, vom Zellsaft abfiltrierte Flüssigkeit den Raum zwischen Wandplasma und dem sich verkleinernden Tonoplasten einnimmt. Doch geht wohl auch hier eine leichte Plasmaauf-

quellung der Kontraktion und Zerteilung des Tonoplasten voran. Die letztere läßt sich aus Gesetzen der Kapillarspannung mechanisch verstehen. Sie beginnt bei *Closterium*, wie auch Kiermayer feststellt, stets von den Polen der Zelle her, bei *Micrasterias* (Abb. 3 *b*) von den verschmälerten Randlappen. Kiermayer (1954, S. 204) bildet *Micrasterias truncata* mit starker Vakuolenkontraktion nach Neutralrotfärbung ab. Die Teilvakuolen sind symmetrisch, den Zwischenräumen der Chloroplastenleisten entsprechend angeordnet (Abb. 4); wo der Saftraum in „Wabenkammern" unterteilt ist, lösen sich diese bei der Vakuolenkontraktion voneinander, runden sich ab, und der Raum zwischen ihnen erscheint von farbloser Flüssigkeit erfüllt.

Was das Verhalten voller Algenzellsäfte betrifft, so konnten wir die alte, bei Cholnoky und Höfler (1930, S. 169) verzeichnete Beobachtung bestätigen, daß *Netrium digitus* niemals eine vitale Vakuolenkontraktion nach Vitalfärbung eintreten läßt. Gleiches gilt für *Cylindrocystis Brebissonii* und wie es scheint auch für die anderen Algen, denen volle Zellsäfte eigentümlich sind.

Scheidl (1935) beschreibt einige Fälle, wo Idioblasten aus dem Hüllblatt der Zwiebelknolle von *Tulipa silvestris* und *Colchicum autumnale* eine starke Kontraktion mit unregelmäßiger Einbuchtung der Vakuolenwandung erfahren, und er schließt, daß Vakuolenkontraktion nicht allgemein nur auf leere Säfte beschränkt ist. Das hat für Gewebszellen sicher Geltung. An *Allium*-Außenepidermen, deren Zellsäfte voll sind, hat ja auch Küster (1926) zuerst das Phänomen der „Spontankontraktion" beschrieben. Diese tritt aber dort nur in einzelnen Zellen nach Vitalfärbung und Verwundung auf, es handelt sich also um „Einzel"-, nicht um „Allgemeinkontraktion". Bei Algen mit vollen Zellsäften ist uns eine vitale Kontraktion noch nicht begegnet. Bei den Algen kann also eine typisch verlaufende Vakuolenkontraktion als ein Indizium für leere Zellsäfte gelten.

III. Rückblick und Besprechung

Die Unterscheidung leerer und voller Zellsäfte läßt sich im allgemeinen leicht und klar treffen. Als Gesamtergebnis der mitgeteilten Versuche ist festzuhalten, daß leere Zellsäfte, deren Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen nach dem Ionenfallenmechanismus erfolgt, bei Algen viel verbreiteter sind und einem viel größeren Prozentsatz der geprüften Objekte zukommen als bei Gewebezellen höherer Pflanzen; dort sind ja volle — nach Akridinorangefärbung grün fluoreszierende — Zellsäfte häufiger als leere.

Außer bei den behandelten Algen sind leere Zellsäfte auch bei etlichen fadenförmigen Grünalgen (*Ulothrix*, *Bulbochaete* u. a.) beobachtet worden, doch müssen diesbezügliche Versuche, die jetzt leicht anzustellen sind, noch auf zahlreichere Arten und Gattungen ausgedehnt werden.

Will man mit vollen Zellsäften arbeiten, so seien vorläufig — außer *Spirogyra*, deren Tanningehalt allgemein bekannt ist — die Mesotaeniales

Netrium digitus und *oblongum*, *Cylindrocystis Brebissonii*, *Mesotaenium* empfohlen.

Bei einer nur die Diffusfärbung der Vakuolen berücksichtigenden Einteilung sind die zahlreichen Chlorophyceen (*Protococcales*, *Tetrasporales*, *Microspora* u. a.), die im Vitalfärbeversuch Körnchenfällung ergeben, zunächst nicht einreihbar. Teilt man die Algen in solche mit speicherstofffreien und speicherstoffführenden Zellsäften, so sind jene Grünalgen den letzteren zuzuzählen; sie wären also den mit vollen Zellsäften ausgestatteten anzureihen. Farbige Granula werden oft in der Vakuole gefällt: bisweilen legen sie sich der Vakuolenwand an und treten dann ins Plasma über (vgl. Guilliermond, Mangenot u. Plantefol 1933, S. 291, P. Dangeard 1947, S. 446, Cholnoky u. Höfler 1950, S. 159). — Nur eine neue Beobachtung an *Microspora* sei vorläufig erwähnt: In Fäden unseres Materials gaben Farbbasen von Neutralrot und Brillantcresylblau überall ein bis zwei dicke farbige Entmischungskugeln je Vakuole, während Rhodamin B nicht anfärbte.

Bei vielen Diatomeen fallen bei Vitalfärbung Entmischungskügelchen im Zellsaft aus, die dann ins Plasma gelangen und den kontrahierten Vakuolen außen aufsitzen (zuletzt Hirn 1954); zur Diffusfärbung der Zellsäfte kommt es nicht.

Für Untersuchungen zur physikalischen Chemie der leeren Zellsäfte (Kinzel) können unsere Algen Material in reicher Auswahl liefern. Prinzipiell wichtige Arbeitsziele für den Zellphysiologen sind die intrazelluläre pH-Bestimmung und die Ermittlung oder Schätzung der Zellsaftpufferung. Hier sind wohl Kinzels (1954) theoretische Betrachtungen wegweisend.

Wir erwähnen von Beobachtungen, die in diesem Sektor verwertbar werden können, einmal die Tatsache der von Art zu Art verschieden intensiven Vakuolenspeicherung. Solche Unterschiede bestehen sichtlich auch zwischen Algen, denen leere Zellsäfte eigen sind. Unsere Protokolle enthalten viele hierher gehörige Notizen. — In Mischwatten verschiedener Oedogonien beobachtet man immer wieder mäßig starke Speicherung in der einen, extrem starke in der anderen Art. Wir hatten in unseren Präparaten oft eine schmale, dickwandige Art mit kapitälierten Zellenden, die sehr stark speicherte. Reproduzierbar werden solche Beobachtungen freilich erst, wenn die Artbestimmung des Materials gelingt; das ist bei Oedogonien aber leider nur selten der Fall. — Die Desmidiaceen sind immer im sterilen Zustand zu erkennen. Unterschiede im Farbspeichervermögen beobachtet man in Mischproben allgemein. Wieweit sie aber artgebunden sind, wieweit sie bei ein und derselben Art modifikativ veränderlich sind oder vom Alter und Entwicklungszustand abhängen, bleibt erst planmäßig zu prüfen. Nach Akridinorangefärbung zeigt z. B. *Arthrodesmus convergens* im leeren Zellsaft eine ausnehmend starke Ionenfärbung, die gelb im Tageslicht, rot im UV-Licht ist. — Die in Hochmoorproben so häufige *Eremosphaera viridis* färbt ihren Zellsaft vital mit den üblichen basischen Farbstoffen, zeigt manchmal auch gute Vakuolenkontraktion, aber die Färbung bleibt oft schwach, nimmt nur langsam zu und steht hinter derjenigen anderer Algen,

die benachbart im Präparat liegen, zurück; auch bleibt meist ein Teil der Zellen ganz ungefärbt [7].

Viel Kopfzerbrechen hat uns im Lauf der vier Ramsauer Sommer eine große, kugelige bis breit-ellipsoidische grüne Alge gemacht, die sich in den Mischproben vom „Hauptgraben" aus dem Schwaigermoos regelmäßig fand, kleiner als typische *E. viridis* war, deren vorläufige Bestimmung aber doch auf *Eremosphaera* führte; die Alge heißt in unseren Protokollen „Pseudoeremosphaera" ad interim. Sie ist durch ein geradezu einzigartiges Farbspeichervermögen ausgezeichnet. Sie färbt sich in Neutralrot tief schwarzrot.

Wir dachten zunächst an hohe Empfindlichkeit der Alge und erhöhtes Speichervermögen im nekrotischen bzw. toten Zustand; auch schien die gespeicherte Farbe im Plasma oder doch nicht allein im Zellsaft lokalisiert zu sein. Es gelangen aber fallweise Plasmolysen der gefärbten Algen mit Zucker, was dafür spricht, daß „Pseudoeremosphaera" schon im Leben die Farbe gierig an sich reißt; vermutlich stirbt sie erst nachher ab, vielleicht eben infolge der übermäßigen Farbanreicherung. An Speicherkraft übertrifft sie alle Mitbewohner des Biotops. Es bleibt zu prüfen, ob die Alge im Protoplasten einen Speicherstoff besitzt, der der gewöhnlichen *Eremosphaera viridis* fehlt, und ob sich etwa auf vitalfärberischer Basis taxonomisch verwertbare Merkmale gewinnen lassen werden — ähnlich wie Hirn bei den Mesotaeniales von *Cylindrocystis Brebissonii* Menegh. (mit vollen Zellsäften und Kopetzkyschen Körperchen) die neue Art *Cylindrocystis gracilis* Hirn (kleiner, mit leeren Zellsäften, ohne die Kopetzkyschen Körperchen, mit anders geformten Pyrenoiden) abtrennen konnte. — Näheren Studiums bedürfen noch einige fadenförmige Desmidiaceen, so *Gymnozyga* mit ihren merkwürdigen Metachromasien und *Hyalotheca*.

Besonderer Aufmerksamkeit seien schließlich die „nicht färbbaren" Algenarten empfohlen: *Closterium juncidum* und *Cl. striolatum* und die Heteroconte *Chlorobotrys regularis*. Der Mangel der Membranfärbbarkeit auf elektroadsorptivem Weg beider *Closterium*-Arten (Höfler u. Schindler 1953) kann natürlich nicht erklären, warum auch im alkalischen, an direkt permeierfähigen Molekülen reichen Farbbad eine Färbung des Vakuoleninhaltes nicht eintritt. Der Zellsaft ist zunächst offenbar leer, frei von Stoffen, die Lösungsspeicherung bewirken. Warum unterbleibt aber gerade bei diesen Arten die Ionenspeicherung?

Als Extremfall sei wiederum auf *Chlorobotrys* (Cholnoky u. Höfler 1950, S. 160, 179) hingewiesen. Wir haben an dieser Heteroconte auch

[7] Hier wären künftig vor allem kolorimetrische Bestimmungen der Farbintensität erwünscht. — Bartels (1954) hat für die Akridinorangespeicherung mikrospektroskopische Messungen auf breiter Grundlage durchgeführt, u. zw. an *Allium*-Innenepidermen, also an Zellen mit im Ruhezustand leeren Zellsäften. Er mißt die Abhängigkeit der Speicherung in der Vakuole von der Konzentration des Farbbades und findet die Innenkonzentration im Gleichgewichtszustand stets um einen konzentrationsunabhängigen Speicherungsfaktor $\sigma = 10{,}8$ größer als die Außenkonzentration. — Sein Schluß, daß diese Konzentrationsabhängigkeit sich nicht mit der „Ionenfallenfunktion" der Vakuole in Einklang bringen lasse, wird von Kinzel (1955) auf seine Berechtigung diskutiert.

in Hunderten von Färbeversuchen der Jahre 1950—1954 eine vitale Zellsaftfärbung niemals beobachtet; vielmehr blieb *Chlorobotrys* in Mischproben immer völlig ungefärbt, wenn ringsum alle anderen, mit vollen oder leeren Zellsäften ausgestatteten Arten gefärbt waren. Kinzel (1954, S. 68) verweist darauf, daß bei Neutralrotfärbung dieses Ausnahmeverhalten ebensowohl durch einen relativ wenig sauren als durch einen „ungepufferten" Zellsaft erklärbar sein könnte. Wir haben auch in unseren zahlreichen Versuchen mit Toluidinblau, das ja eine viel höhere Dissoziationskonstante und höheren Umschlagsbereich besitzt, an *Chlorobotrys* keine Zellsaftfärbung beobachtet. Kinzel empfiehlt für Extremfälle die Behandlung mit einem Farbstoff hoher Dissoziationskonstante in stark alkalischer Lösung als aussichtsreichstes Mittel, um eine Farbspeicherung doch herbeizuführen. Gelänge auf diesem Weg die Färbung von *Chlorobotrys*, so könnten entsprechend geleitete Reihenversuche den Schlüssel zur Messung des Pufferungsgrades geben, der ja wohl an schlecht gepufferten Säften zuerst erfaßt werden müßte. Damit käme man aber auch dem alten Arbeitsziel der kolorimetrischen pH-Messung der Zellsäfte (Strugger 1941) einen Schritt näher; denn wie Kinzel zeigte, ist die von ihm vorgeschlagene Methode zur intrazellulären pH-Messung nur auf gepufferte, leere Zellsäfte anwendbar.

Mehr als bisher wird bei Vitalfärbeversuchen auch die Versuchsdauer beachtet und in zulässigen Grenzen variiert werden müssen. Auch dies geht aus Kinzels Ausführungen hervor. Zwei prinzipielle Schwierigkeiten werden dabei zu beachten sein: die Möglichkeit der Entfärbung von Zellsäften infolge von Redoxvorgängen bei langer Versuchsdauer (Kiermayer 1954/55) und die Möglichkeit nachträglicher Aufnahme von zuerst elektroadsorptiv in der Zellwand gespeichertem Farbstoff, der in permeierfähige Form übergeht und dann ins Innere des Protoplasten gelangt (Höfler u. Schindler 1953, Hirn 1953, S. 459, 1954, S. 580).

Zusammenfassung

1. Die meisten Süßwasseralgen, bei denen Behandlung mit basischen Farbstoffen diffuse Färbung der Vakuolen bewirkt, haben leere Zellsäfte. Die Anfärbung erfolgt nach dem Ionenfallenmechanismus.

2. Zur Unterscheidung voller und leerer Zellsäfte dienen die Erscheinungen der Metachromasie, die vitale Entfärbung der leeren Säfte durch NH_3, die Lage der Färbeschwellen in der pH-gestuften Farbbadreihe (hoch bei leeren, niedrig bei vollen), die Nichtfärbbarkeit leerer Zellsäfte durch Farbstoffe mit niedriger Dissoziationskonstante (Rhodamin B), die Fähigkeit zur Allgemeinkontraktion der Vakuolen, die für Zellen mit leeren Säften kennzeichnend ist. Beispiele für die Anwendung dieser Teste werden beigebracht.

3. Es erscheint bei Algen in der Regel als Artmerkmal, ob die Zellsäfte voll oder leer sind. Nur selten kommt bei ein und derselben Art ein Wechsel vor.

4. Beispiele voller Zellsäfte geben, abgesehen von *Spirogyra*, die Mesotaenialen *Netrium digitus* und *oblongum*, *Cylindrocystis Brebissonii*, *Mesotaenium*.

5. Die Süßwasseralgen, zumal die auch im nichtfruchtenden Zustand kenntlichen Arten (Desmidiales), können für aktuelle Aufgaben physikochemischer Zellanalyse — intrazelluläre pH-Bestimmung (Kinzel) etc. — gutes Material liefern.

Literatur

Bartels, P., 1954: Quantitative mikrospektroskopische Untersuchung der Speicherungs- und Permeabilitätsverhältnisse akridinorangegefärbter Zellen. Planta *44*, 341.

Cholnoky, B. von, und K. Höfler, 1950: Vergleichende Vitalfärbungsversuche an Hochmooralgen. S.ber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. 1, *159*, 143.

Czaja, A. T., 1954: Untersuchungen über metachromatische Färbungen von Pflanzengeweben. II. Basische Farbstoffe. Planta *21*, 331.

Dangeard, P. A., 1916: Nouvelles recherches sur le système vacuolaire. Bull. soc. Bot. Fr. *73*.

Dangeard, Pierre, 1947: Cytologie végétale et cytologie générale. Paris.

Drawert, H., 1939: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende Zelle. I. Versuche mit Rhodaminen. Planta *29*, 376.

— 1940: Desgl. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora *134*, 159.

Flasch, A., 1955: Die Wirkung von Coffein auf vitalgefärbte Pflanzenzellen. Protoplasma *44*, 412.

Guilliermond, A., G. Mangenot et L. Plantefol, 1933: Traité de cytologie végétale. Paris.

Heimerl, A., 1891: Desmidiaceae alpinae. Verh. d. k. k. zool.-bot. Ges. in Wien *41*, 587.

Hirn, I., 1953: Vitalfärbungsstudien an Desmidiaceen. Flora *140*, 453.

— 1954: Vitalfärbung von Diatomeen mit basischen Farbstoffen. S.ber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, *162*, 571 (1953).

Höfler, K., 1946: Sur la coloration vitale des vacuoles par l'orange d'acridine et le rouge neutre. C. r. Ac. Sc. Par. *223*, No. 7, 335.

— 1947: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie *2*, 13.

— 1948: Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. S.ber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, *156*, 585.

— 1949 a: Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. Biol. gen. (l.; Ö.) *19*, 90.

— 1949 b: Fluorochromierungsstudien an Pflanzenzellen. Beitr. zur Fluoreszenzmikroskopie, Mikroskopie (1. Sonderband) *46*.

— 1951: Plasmolyse mit Natriumkarbonat. Zur Frage des Plasmalemmas bei Süßwasseralgen und bei Gewebszellen von Landblütenpflanzen. Protoplasma *40*, 426.

— 1952: Über die Farbionenpermeabilität der Tonoplastenmembran. Ber. dtsch. bot. Ges. *65*, 183.

— 1954: Sur la coloration vitale et fluorescente des algues. 8e Congr. intern. de Botanique, Paris 1954, Rapports et Communications, Sect. 17, pag. 10.

— und W. Loub, 1952: Algenökologische Exkursion ins Hochmoor auf der Gerlosplatte. S.ber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, *161*, 263.

Höfler, K., und H. Schindler, 1951: Vitalfärbung von Algenzellen mit Toluidinblaulösungen gestufter Wasserstoffionenkonzentration. Protoplasma *40*, 137.
— — 1952: Algengallerten im Vitalfärbeversuch. Öst. Bot. Z. *99*, 529.
— — 1953: Vitalfärbbarkeit verschiedener Closterien. Protoplasma *42*, 296.
Johannes, H., 1941: Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien II. Die Inturbanz der Färbung mit Rhodaminen. Protoplasma *36*, 181.
Kiermayer, O., 1954: Die Vakuolen der Desmidiaceen, ihr Verhalten bei Vitalfärbe- und Zentrifugierungsversuchen. S.ber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, *163*, 175.
— 1955: Über die Reduktion basischer Vitalfarbstoffe in pflanzlichen Vakuolen. Ebenda *164*. (Vgl. Sitz.-Anzeiger 91, Nr. 15 v. 9. Dez. 1954, 225.)
Kinzel, H., 1954a: pH-Werte alkalischer Phosphatpufferlösungen. Protoplasma *43*, 441.
— 1954b: Theoretische Betrachtungen zur Ionenspeicherung basischer Vitalfarbstoffe in leeren Zellsäften. Protoplasma *44*, 52.
— 1955: Referat über Bartels 1954 (s. o.). Protoplasma *44*, 470.
Kopetzky-Rechtperg, O., 1938: Mitteilung über eine Protoplasmastruktur der Desmidiale *Netrium digitus* und über einige Zellinhaltskörper dieser Alge. Protoplasma *31*, 607.
— 1949: Zellbau und Zelleinschlüsse bei Conjugaten, besonders Desmidiales. Protoplasma *39*, 106.
— 1955: Beobachtungen an Protoplasma und Chloroplasten der Alge *Netrium digitus*. Protoplasma *44*, 322.
Krieger, W., 1933: Die Desmidiaceen Europas mit Berücksichtigung der außereuropäischen Arten. Rabenhorsts Krypt.-Flora XIII, Abt. 1.
Küster, E., 1926: Beiträge zur Kenntnis der Plasmolyse. Protoplasma *1*, 73.
— 1926/27: Über Vitalfärbung von Pflanzenzellen mit Phthaleinen, I u. II. Ber. d. Oberhess. Ges. f. Natur- u. Heilkunde Gießen, N. F. Naturwiss. Abt. *11*, 8 u. 65.
Lison, L., 1935: Sur la détermination du pH intracellulaire par les colorants vitaux indicateurs. L'« erreur métachromatique ». Protoplasma *24*, 453.
Ostwald, W., Die kleine Farbmeßtafel. Ausgabe C. „Muster-Schmidt", K.-G., Göttingen.
Pascher, A., 1925: Heterokontae. Die Süßwasserflora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz *11*, 1.
Pecksieder, M. E., 1950: Zur Frage der Farbionenpermeabilität des Protoplasma. Biol. gen. *19*, 224.
Pfeffer, W., 1886: Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. Unters. Bot. Inst. Tübingen *2*, 179.
Ruhland, W., 1908: Beiträge zur Permeabilität der Plasmahaut. Jb. wiss. Bot. *46*, 1.
Scheidl, W., 1955a: Vakuolenkontraktion bei vollen Zellsäften an Zwiebelzellen von *Tulipa silvestris* und *Colchicum speciosum*. Protoplasma *44*, 336.
— 1955b: Auslösung von Vakuolenkontraktion durch undissoziierte Basen. S.ber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, *163*, 645. (Vgl. Sitz.-Anzeiger 91. Nr. 15 v. 9. Dez. 1954, 228.)
Stiegler, A., 1930: Vitalfärbungen an Pflanzenzellen mit Cresylechtviolett. Protoplasma *39*, 493.
Strugger, S., 1936: Vitalfärbung der Chloroplasten mit Rhodaminen. Flora *131*, 113.
— 1938: Die Vitalfärbung des Protoplasmas mit Rhodamin B und 6G. Protoplasma *30*, 85.

Strugger, S., 1940 a: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jena. Z. Naturw. *73*, 97.

— 1940 b: Neues über die Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma *34*, 601.

— 1941: Zellphysiologische Studien mit Fluoreszenzindikatoren. I. Basische, zweifarbige Indikatoren. Flora *135*, 101.

Weber, F., 1930: Vakuolenkontraktion vitalgefärbter Elodeazellen. Protoplasma *9*, 106.

Zanker, V., 1952 a: Über den Nachweis definierter reversibler Assoziate („reversible Polymerisate") des Acridinorange durch Absorptions- und Fluoreszenzmessungen in wäßriger Lösung. Z. physikal. Chem. *199*, 225.

— 1952 b: Quantitative Absorptions- und Emissionsmessungen am Acridinorangekation bei Normal- und Tieftemperatur im organischen Lösungsmittel und ihr Beitrag zur Deutung des metachromatischen Fluoreszenzproblems. Ebenda *200*, 250.

Die Teilung der Proplastiden und Chloroplasten bei *Agapanthus umbellatus* l'Hérit

Von

Ursula Fasse-Franzisket

Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster i. W.

Mit 23 Textabbildungen

(Eingelangt am 1. April 1955)

I. Einleitung und Fragestellung

Seit den klassischen Untersuchungen von Nägeli (1846), Sanio (1864) und Kny (1872) über die Vermehrung der Chloroplasten ist die Frage, ob diese Gebilde Zellorganelle *sui generis* sind oder durch Neubildung aus dem Plasma oder gar durch Umwandlung aus Chondriosomen entstehen, ein Gegenstand lebhafter Diskussion gewesen. Ein entscheidender Beitrag für den Beweis der Chloroplastenkontinuität wurde in jüngster Zeit von Strugger (1950, 1953, 1954, dort auch eingehende Behandlung der Literatur) durch die Entdeckung des Primärgranums in den Plastidenanlagen (Proplastiden) geliefert. Aus diesen Ergebnissen resultierte die Frage nach der Metamorphose der Proplastiden zum somatischen Chloroplasten. Böing (1955) und Grave (1954) bestätigten durch zytomorphologische Untersuchungen, daß sich die Grana der Plastiden ausschließlich vom Primärgranum herleiten. Es blieb aber noch die Frage offen, wieweit diese neuen Kenntnisse vom Differenzierungsvorgang der formveränderlichen, unigranulären Proplastiden zu den fest strukturierten, multigranulären Chloroplasten mit den klassischen Beobachtungstatsachen über Plastidenteilung in Einklang zu bringen sind. Werden tatsächlich bei deutlich ergrünten Chloroplasten noch Fragmentationen der ganzen Plastidensubstanz vollzogen? Zwar konnte die Durchtrennung weit fortgeschrittener Teilungsstadien von verschiedenen Autoren verfolgt werden, aber welchen Differenzierungsgrad der Feinbau der Chloroplasten beim Teilungsvollzug erreicht hatte, wurde nicht erläutert. Schon Schimper erkannte 1885, daß in einiger Entfernung vom Vegetationskegel, in der Zone, in der bekanntlich auch Wachstum und Teilung der Zellen am lebhaftesten vor sich gehen, viele Teilungsstadien der Plastiden auffindbar sind. Einen ähnlichen Hinweis geben auch Kusunoki und Kawa-

saki (1936), daß nämlich in ausgewachsenen Zellen keine Plastidenteilungen durchgeführt werden. Eine Beziehung dieser Befunde zu der Ausbildung der multigranulären Struktur oder zu der Beschaffenheit des Stromaleibes konnte seinerzeit jedoch noch nicht aufgestellt werden. Darüber hinaus interessiert die Frage, wie sich die von Strugger (1950, 1953, 1954) aufgezeigten Proplastidenteilungen zu der Gesamtteilungsrate der Plastiden verhalten. Wird auf diesem Frühstadium der Chloroplastenentwicklung die Mehrzahl der Plastidenteilungen durchgeführt bzw. angelegt, oder vollziehen die Jungchloroplasten noch lebhafte Teilungen? Ferner war es das Ziel dieser Arbeit, in Anlehnung an die Studien über Moose von Heitz (1922) die Beziehung zwischen Differenzierung und Teilung der Plastiden zu den Entwicklungsstadien der Zellen aufzufinden. Meine Untersuchungen beschäftigten sich außerdem mit der möglichen Beeinflussung der Entwicklung und Teilung der Plastiden durch äußere Faktoren. Bisher liegt so gut wie kein Beobachtungsmaterial über den Einfluß vor, den verschieden starkes weißes Licht oder verschiedenfarbiges Licht auf die Ausbildung der Plastidenstruktur während der Ergrünung etiolierter Plastiden ausüben.

II. Material und Methode

Das Studium der Plastidenmetamorphose und -vermehrung wurde an den Blättern von *Agapanthus umbellatus* vorgenommen. Für die geplanten Untersuchungen waren gerade die Monokotylenblätter aus mehreren Gründen besonders geeignet: Sie besitzen eine basale meristematische Zuwachszone, die während des gesamten Blattwachstums in Tätigkeit bleibt. Einzelne Zellteilungen finden auch noch in den nahen distalen Bereichen der Blattbasis statt. Dadurch sind alle Entwicklungsstadien der Blattzellen leicht zugänglich. Durch die Eigenart der Wuchsform der Pflanze bleiben die Blätter in ihrem unteren Teil verhältnismäßig lange Zeit fest zusammengelagert. Da die jungen Blätter ganz allmählich der Lichteinwirkung ausgesetzt werden, läuft die Differenzierung der Chloroplasten sehr verzögert ab. Dadurch können sämtliche Übergangsstadien von unigranulären Proplastiden der farblosen Blattbasis bis zu den funktionstüchtigen Chloroplasten der kräftig grünen Blattspreite gut untersucht werden.

Für die Untersuchungen wurden Flächenschnitte von der Blattunterseite seitlich der Mittelrippe hergestellt und in Leitungswasser eingelegt. Nach Entfernen der Interzellularluft mittels einer Wasserstrahlpumpe wurden nur solche Zellen zur Untersuchung herangezogen, deren Plasmaströmung und normales Aussehen des Kernes und der Chondriosomen die volle Vitalität der Zellen indizierten.

Als optische Ausrüstung diente ein binokulares Standard-Mikroskop (Zeiß-Winkel) GF 525. An Objektiven fanden die Achromate 40 N. A. 0,65 und die 1/12 homogene Ölimmersion N. A. 1,3 in Verbindung mit den Okularen 8 × und 12,5 × Verwendung. Die photographischen Aufnahmen sind mit dem Panphot (Leitz) oder mit der Leica in Verbindung mit dem Miflex-Aufsatz hergestellt worden. Diese wie auch die Handzeichnungen sind mit Ausnahme der Abb. 17 alle an lebendem, ungefärbtem Material angefertigt worden. Die Größen der Plastiden wurden durch Messung mit dem Okularmikrometer ermittelt.

Zur Feststellung der Vermehrungsrate der Proplastiden und Chloroplasten habe ich die Anzahl der Plastiden pro Zelle unter dem Mikroskop ausgezählt. Die

Auszählung konnte an farblosen postmeristematischen und an voll ausdifferenzierten Zellen des Blattmesophylls ohne Schwierigkeiten vorgenommen werden. Um nun beurteilen zu können, wieweit mit dieser Zählmethode statistisch zuverlässige Messungen gemacht werden können, wurde der subjektive Meßfehler einmal für eine farblose postmeristematische und zweitens für eine voll ergrünte Zelle ermittelt. Die jeweils gleichen Zellen wurden zehnmal ausgezählt und der mittlere Fehler einer Zählung sowie des Mittelwertes errechnet. Die Ergebnisse der Einzelzählungen und die Rechenmethode sind in der Arbeit aufgeführt, die als Dissertation im Botanischen Institut der Universität Münster vorliegt. Für die hier ausgezählte junge Zelle mit durchschnittlich 34 Proplastiden betrug der mittlere Fehler einer Zählung ± 3%, der mittlere Fehler des Mittelwertes ± 1%. Für die ausgewachsene Zelle mit ihren durchschnittlich 124 Chloroplasten betrug der Fehler einer Zählung ± 1,5%, der des Mittelwertes jedoch nur ± 0,4%. Diese Prüfung der Zählmethode bestätigt ihre Zuverlässigkeit.

III. Die Vermehrung der Proplastiden und Chloroplasten im Verlaufe der Histogenese von *Agapanthus*-Blättern

1. Quantitative Untersuchungen zur Frage der Anzahl der Proplastiden und Chloroplasten

Jedes junge *Agapanthus*-Blatt zeigt basal einen weißen Blattabschnitt (I). Daran schließt sich ein gelbgrüner (II), der in einen hellgrünen (III) übergeht und endlich einem kräftig grünen Blattabschnitt (IV) Platz macht, dessen Färbung sich über die Blattspreite hin noch vertieft (V) (Abb. 1). Die Ausdehnung dieser Blattzonen ist sehr variabel, da sie jeweils vom Lichtgenuß und von der Jahreszeit sowie vom Blattalter abhängig ist. Werden die Blätter in ihren unteren Partien nur von den Rändern her belichtet, so zeigt es sich, daß auf einer Waagerechten von der Mittelrippe zum Blattrand die Zonen I bis IV entstehen. Es scheint demnach also nicht der Differenzierungsgrad der Zellen des Blattgewebes allein für die Zonierung verantwortlich zu sein, sondern vornehmlich die Einwirkung des Lichtes.

Tab. 1. *Mittelwertstabelle.* Näheres im Text.

Zone	Blatt Nr.										Mittelw. aus 10 Blättern	Mittlerer Fehler des Mittelwertes aus 10 Blättern
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
I	25,9	25,7	20,3	23,3	29,9	23,0	21,5	24,1	26,1	29,8	24,96	± 1,08
II	41,1	47,7	42,0	46,6	51,8	55,8	59,0	65,9	64,5	53,9	52,85	± 2,80
III	79,5	86,7	69,0	92,1	93,2	97,1	89,7	81,0	85,5	87,0	86,08	± 2,69
IV	98,9	118,6	97,1	111,1	121,1	131,5	95,5	101,9	113,1	109,9	109,87	± 3,68
V	101,4	119,4	94,8	110,0	122,1	129,0	96,0	99,7	114,2	106,4	109,30	± 3,88

Zur Morphologie der Plastiden in den betreffenden Blattzonen ist zu bemerken, daß in Zone I die postembryonale, unigranuläre Phase der Plastidenentwicklung auffindbar ist, die Strugger (1950) als Proplastiden bezeichnete. In der II. Zone liegen multigranuläre Plastiden vor, deren Grana nur wenig Pigmente enthalten und daher schwer kenntlich sind. Das Stroma ist noch amöboid und bildet häufig Fäden oder breitere Pseudopodien. An granafreien Bezirken wird seine Farblosigkeit deutlich. Die Plastiden dieser Entwicklungsstufe sind von sehr unregelmäßiger Gestalt. In der hellgrünen Zone III differenzieren sie sich zu Jungchloroplasten, deren Charakteristikum die festere, linsenförmige Gestalt ist. Die Amöboidie des Stromas ist nahezu verlorengegangen, die Grana heben sich durch reicheren Chlorophyllgehalt distinkt vom Stroma ab. Als fest strukturierte, voll funktionstüchtige Chloroplasten liegen die Plastiden in der IV. Zone vor, deren Größe und Granazahl in der V. Zone noch erheblich ansteigt (Abb. 1).

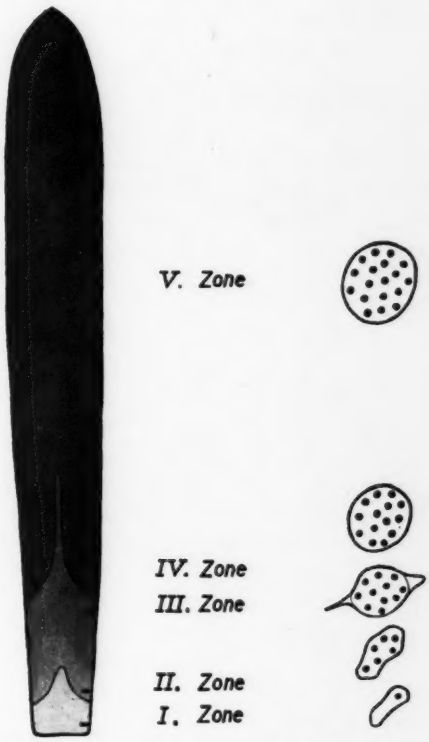


Abb. 1. Der Entwicklungsgradient im jungen *Agapanthus*-Blatt. Rechts: Darstellung des Differenzierungsgrades der Plastiden in den betreffenden verschieden pigmentierten Zonen.

Für diese fünf Zonen wurde die Anzahl der Proplastiden und Chloroplasten bestimmt. Die Auszählungen der Plastiden wurden an zehn benachbarten Mesophyllzellen jeder Zone vorgenommen. Die aus jeweils zehn benachbarten Mesophyllzellen der einzelnen Zonen jedes Blattes gewonnenen Mittelwerte sind in Tab. 1 aufgeführt. Die Einzelzählungen sowie die eingehende Untersuchung auf statistische Realität der Differenzen der Plastidenanzahl in den Zonen I bis IV sind in der Dissertationsschrift im Botanischen Institut der Universität Münster niedergelegt. In die mittleren Fehler des definitiven Mittelwertes aus zehn Blättern sind die mittleren Fehler aus den Streuungen um den individuellen Fehler des Mittelwertes der Einzelzählungen eines Blattes eingerechnet. Wie Tab. 2 zeigt, liegt die dreifache Größe der mittleren Fehler der Differenzen zwischen den

Zonen I bis IV unter der Größe der jeweiligen Differenz. Der Unterschied in der mittleren Plastidenzahl zwischen Zone IV und V dagegen liegt weit unter der statistischen Streuung der einzelnen Mittelwerte, woraus geschlossen werden kann, daß die Plastidenzahl in beiden Zonen praktisch gleich ist. Dadurch ist eindeutig der Beweis erbracht worden, daß sich die Vermehrung der Plastiden n u r während der Plastidenmetamorphose vollzieht.

Tab. 2. *Mittlere Differenzen zwischen den Zonen bei allen zehn Blättern.*

	Mittlere Differenz bei allen 10 Blättern	Mittlerer Fehler der Differenz	3mal mittlerer Fehler der Differenz
△ I— II	27,89	± 3,00	9,00
△ II—III	33,23	± 3,88	11,64
△ III—IV	23,79	± 4,56	13,68
△ IV— V	0,67	± 5,53	16,59

Zur Untersuchung gelangten junge, mittellange und ausgewachsene Blätter. Während bei den Blättern 1 bis 4 die Zellkomplexe regellos dem Blattgewebe der einzelnen Zonen an der Blattunterseite entnommen waren, erfolgte bei den Blättern 5 bis 10 die Wahl der Zellen nach folgender topographischer Festlegung: Beim 5. und 6. Blatt wurden in allen Zonen 10 Zellen einmal von der Blattunterseite und zum anderen von der Blattoberseite zwischen der 2. und 3. Leitbündelbahn vom Blattrande her ausgezählt. Das untersuchte Zellenmaterial des 7. bis 10. Blattes unterlag insofern einer Selektion, als für sie die Größe der Zellen entscheidend war. Die Auszählungen beim 7. Blatt wurden in der 2., beim 8. Blatt in der 3. und beim 9. Blatt in der 4. subepidermalen Zellenschicht von der Blattunterseite her angestellt. Die mittlere Zellgröße jeder Zone zeigt eine Zunahme von der 2. zur 4. Zellschicht. Beim 10. Blatt wurden in allen Zonen nur Zellen etwa gleicher Größe ausgezählt.

In der Zone II ist die Streuung der Einzelzahlen am größten. Die Differenz der Mittelwerte erreicht zwischen den Zonen II und III den höchsten Wert. Daraus kann gefolgert werden, daß die Plastidenteilungen in der II. Zone sehr intensiv vor sich gehen. Die Blätter 1 (27 cm) und 3 (20 cm) erreichten in den Zonen IV und V nur eine relativ geringe Gesamtzahl an Chloroplasten. Die gleich langen Blätter 2 (28 cm) und 4 (17 cm) waren breiter als 1 und 3 und zeigten auch eine relativ höhere Gesamtzahl der Chloroplasten je Zelle in den Zonen IV und V. Da die breiteren *Agapanthus*-Blätter größere Zellen besitzen als die schmalen Blätter, ist anzunehmen, daß die Zellgröße möglicherweise für die endgültige Chloroplastenzahl entscheidend ist. Beim 10. Blatt sind nur Zellen etwa gleicher Größe ausgezählt worden. Die Streuung der Plastidenzahl in den jeweiligen Zonen war relativ gering, da ein wesentlicher Variabilitätsfaktor, die unterschiedliche Zellgröße, weitgehend ausgeschaltet wurde. Die Zählungen wur-

den beim Blatt 6 an Gewebeschnitten von der Blattoberseite vorgenommen. Die endgültige Chloroplastenzahl pro Zelle ist im Palisadenparenchym größer als im Schwammparenchym, wie der Vergleich mit dem etwa gleich langen und breiten Blatt 5 zeigt.

2. Die Beziehung der Metamorphose und Teilung der Plastiden zum Streckungswachstum der Zellen

Die Tatsache, daß die Metamorphose und Teilung der Plastiden in der basalen Blattregion vor sich gehen, läßt einen Zusammenhang mit dem Zellwachstum vermuten. Zur Klärung dieser Frage wurden die Mittelwerte (aus jeweils zehn benachbarten Zellen) der Anzahl und Größe der Proplastiden und Chloroplasten mit der Länge und Breite der entsprechenden Mesophyllzellen verglichen. Die Untersuchungen wurden a) an jungen *Agapanthus*-Blättern von 6 bis 13 cm Länge, b) an frei präparierten, kleinen Blättchen von 1 bis 5 cm Länge und c) an etiolierten Blattbasen ausgewachsener Blätter vorgenommen.

Zu a) Der Verlauf der Kurven in Abb. 2 und 3 läßt darauf schließen, daß die Differenzierung der Plastiden relativ nahe dem Blattgrunde einsetzt. Es handelt sich um eine junge Pflanze, deren wenige ausgewachsene Blätter nicht allzu dicht die jüngeren umschließen, so daß durch die Lichteinwirkung bereits der basale Blattanteil ergrünen kann. Bei 5 bis 6 cm Entfernung von der Blattbasis ist die Vermehrungsrate abgeschlossen (2). Die Größenzunahme der Chloroplasten läuft der Plastidenentwicklung parallel (3). Für die Blattbasis fehlen die Größenangaben der Plastiden, da sie dort als amyloplastische Proplastiden vorliegen, deren schwankender Stärkegehalt keine zuverlässige Messung zuläßt. Auch das Zellwachstum ist bei 6 cm Entfernung von der Blattbasis im großen und ganzen abgeschlossen (4). Die anfänglich 20 bis 25 μ langen Meristemzellen haben sich schon bei 2 cm Abstand vom Blattgrund um fast das Doppelte ihrer Längenausdehnung gestreckt. Dieses führt zu der Auffassung, daß das Maximum der Zellstreckung der Hauptvermehrung der Plastiden vorausläuft.

Dieser Befund wird besonders deutlich, wenn die prozentualen Anteile der Zellstreckung, der Plastidenvermehrung und Plastidengröße in einem Koordinatensystem zusammen aufgetragen werden (Abb. 5). Die hier aufgezeichneten Werte wurden an einem 7,0 cm langen Blatt einer kräftigen *Agapanthus*-Pflanze gewonnen. Sie sind in Prozenten von der Gesamtgrößenzunahme der Zellen und Plastiden sowie von der Plastidenvermehrungsrate pro Zelle dargestellt.

Während das Wachstum der Moos-Chromatophoren nach Heitz (1922) parallel der Streckung der Zellen verläuft, fallen demnach bei *Agapanthus* die Maxima der Größenzunahme der Chloroplasten und der Hauptvermehrung zusammen. Diese werden aber erst erreicht, nachdem schon bei 2 cm Entfernung von der Blattbasis — im untersuchten Fall — die Zellstreckung ein deutliches Maximum aufweist. Im Gegensatz zu der Entwicklung der Moos-Chromatophoren, die kein Wachstum mehr nach Abschluß der Vermehrung zeigen (Heitz), wurde bei den

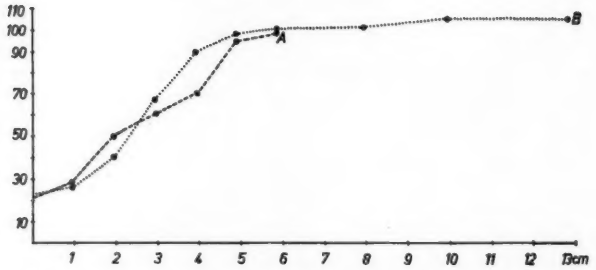


Abb. 2. Die Anzahl der Proplastiden und Chloroplasten.

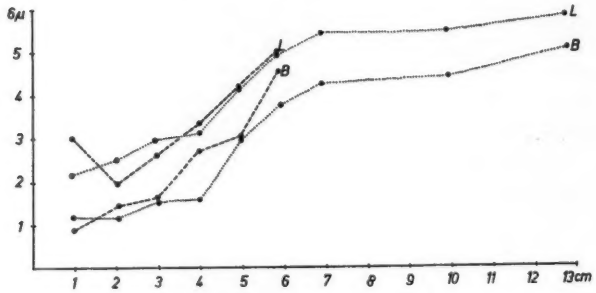


Abb. 3. Die Länge und Breite der Plastiden.

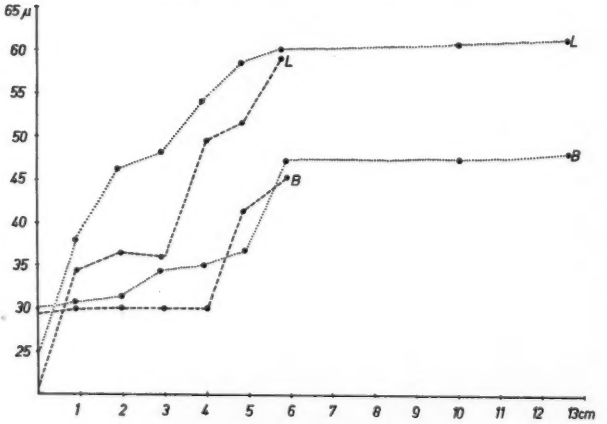


Abb. 4. Die Länge und Breite der Zellen.

Abb. 2, 3 und 4. Die Werte für ein 6 cm langes und 1,3 cm breites Blatt (*A*) und für ein 13 cm langes und 2 cm breites Blatt (*B*) derselben Pflanze. Auf den Abszissen ist der Abstand von der Blattbasis in Zentimetern angegeben. Die Ordinaten zeigen in Abb. 2 die Anzahl, in Abb. 3 die Länge (*L*) und die Breite (*B*) der Plastiden in Mikron. In der Abb. 4 zeigen sie die Länge (*L*) und die Breite (*B*) der Zellen ebenfalls in Mikron an.

Agapanthus-Chloroplasten auch nach Abschluß der Vermehrung ein weiteres Wachstum festgestellt.

Zu b) Nach diesen Beobachtungen wäre anzunehmen, daß ein ganz bestimmter entwicklungsphysiologischer Zustand der Zellen erreicht sein müßte, bevor die Metamorphose der Plastiden einsetzen kann. Zur Untersuchung der Frage, ob eine derartige Voraussetzung besteht, wurden Beobachtungen an frei präparierten, also dem Licht ausgesetzten, sehr kleinen *Agapanthus*-Blättchen, die an der Pflanze belassen waren, angestellt. Dabei fand sich, daß während der Zellteilung und -streckung die embryonale Plastidenphase nicht erhalten bleibt, sondern daß durch den Lichtgenuß schon am Blattgrund die Ausbildung der multigranulären Struktur und die Pigmentsynthese einsetzt. Ein Blättchen von 30 mm Länge und 8 mm Breite wies beispielsweise bei einer durchschnittlichen Zellgröße von nur 37 × 37 μ die Anzahl von 60 bis 75 Jungchloroplasten pro Zelle auf, mit einer Größe von 3 × 2 μ.

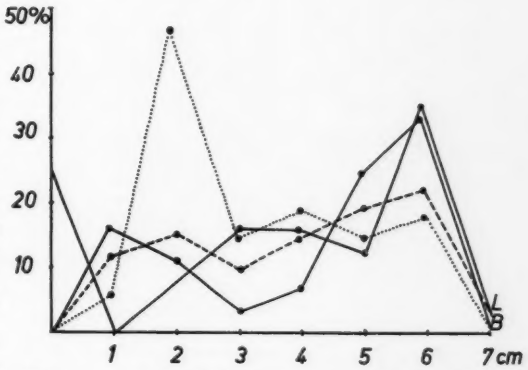


Abb. 5. ---- Vermehrungsrate der Chloroplasten, ... Streckungswachstum der Zelle, ——— Längenzunahme der Chloroplasten (*L*), ——— Breitenzunahme der Chloroplasten (*B*).

Zu c) Die Untersuchungen der basalen etiolierten Region von drei verschiedenen ausgewachsenen Blättern kräftiger *Agapanthus*-Pflanzen führten zu dem in Tab. 3 aufgestellten Ergebnis. Aus der Tabelle geht hervor, daß die Zellen durch den Lichtabschluß stark in die Länge gestreckt sind. Die Werte über die Anzahl und Größe der darin befindlichen Plastiden lassen aber auf ihren postembryonalen Charakter schließen.

Bei *Agapanthus umbellatus* geht demnach beim Blattwachstum die Differenzierung der Zellen der der Plastiden voraus. Wird durch die Umweltbedingungen die Möglichkeit des Ergrünens früher gegeben, so setzt die Entwicklung zum somatischen Chloroplasten während des Zellwachstums oder im Extrem sogar im postmeristematischen Gewebe ein, wie es auch beim Vegetationskegel von Dikotylen zu beobachten ist.

Daraus läßt sich schließen, daß der Lichtgenuß der ausschlaggebende Faktor für die Metamorphose der Plastiden sein muß. Weder der Entwicklungszustand der Zellen noch die Größe der Proplastiden scheinen einen wesentlichen Einfluß auf die Plastidendifferenzierung und -teilung zu besitzen.

Tab. 3. *Zellgröße, Plastidenzahl und -größe in der etiolierten Blattbasis ausgewachsener Blätter.*

Blattgröße	Zellgröße	Plastidenzahl	Plastidengröße
40,0 cm lang, 3,4 cm breit	105 × 40 µ	21	3,0 × 1,8 µ
	107 × 44 µ	30	
	130 × 43 µ	27	
	100 × 47 µ	25	
	155 × 43 µ	30	
37,0 cm lang, 2,4 cm breit	140 × 52 µ	38	2,8 × 1,6 µ
	85 × 52 µ	26	
	130 × 50 µ	31	
	140 × 50 µ	35	
	110 × 43 µ	27	
56,0 cm lang, 3,0 cm breit	100 × 43 µ	23	3,9 × 2,0 µ
	85 × 36 µ	20	
	71 × 53 µ	23	
	100 × 47 µ	22	
	115 × 46 µ	26	

Zu einem ähnlichen Schluß kam Heitz (1922) bei seinen Untersuchungen an *Funaria-* und *Mnium*-Arten. Aus der Tatsache, daß die Zellen dieser Moosarten in Dunkelkulturen langgestreckt sind und verhältnismäßig wenig Plastiden enthalten und daß die Chloroplasten in ausgewachsenen Zellen abgetrennter Blätter sich erneut teilen, folgerte er, daß „die Verknüpfung zwischen Chloroplastenteilung und Zellstreckung keine unbedingte ist".

IV. Der Teilungsvorgang bei Proplastiden und Chloroplasten

1. Die Teilung der Proplastiden

Die einzelnen Stadien der Proplastidenteilung an einem Objekt zu verfolgen und damit die für die gesamte Teilung beanspruchte Zeit festzustellen, ist wegen mangelnden Kultivierungsmöglichkeiten von Gewebeschnitten nicht durchführbar. Selbst die fertigen Chloroplasten zeigen bei der Dauerbeobachtung — wie noch erläutert wird — in gut vitalen Zellen von Schnittpräparaten nach 2 bis 3 Stunden bereits die ersten Degenerationserscheinungen. Diese hochgradige Empfindlichkeit der Plastiden gegenüber Änderungen äußerer Einflüsse, die durch die Isolation von Gewebekomplexen hervorgerufen wird, tritt in verstärktem Maße bei den Proplastiden in noch wachsenden Zellen in Erscheinung. Die beginnende Schädigung der Plastiden zeigt sich darin, daß die starke Formveränderlichkeit des Stromas allmählich nachläßt und mehr und mehr eine Abkugelung eintritt.

In einem Fall ist es mir gelungen, durch fast zweistündige Beobachtung eines in den Grana ergrünten, bereits tief eingeschnürten Teilungsstadiums den endgültigen Teilungsvollzug zu verfolgen (Abb. 6). Es ist zu beob-

achten, daß das Stroma einen ständigen Formwechsel vollzieht. Dadurch verschieben sich die Insertionsstellen des Verbindungsfadens am Stromarand.

An die Frage nach der Proplastidenteilung schließt sich die Frage nach ihrer Synchronisierung mit der Kern- und Zellteilung an. In der einschlägigen Literatur finden sich widersprechende Angaben. Nach Heitz (1922, 1923) vollziehen sich bei Bryophyten die Plastidenteilungen während der Prophase der Karyokinese. Dagegen stellten Sapĕhin (1911) und Kiyohara (1932) allgemein fest, daß erst nach Vollendung der Kernteilung eine intensive Plastidenvermehrung einsetzt. Außer den Befunden an Algen und bestimmten Bryophyten (*Anthoceros*, Scherrer 1915,

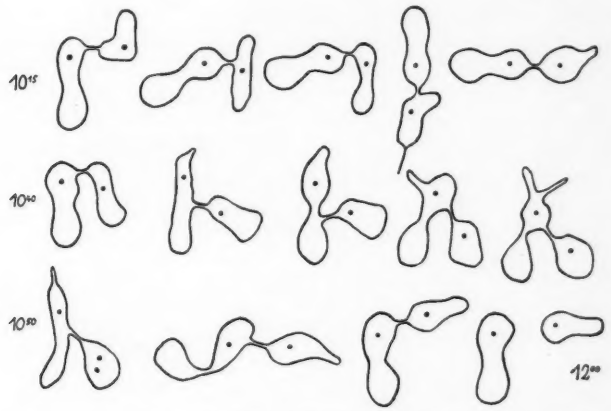


Abb. 6. Der Teilungsvollzug einer bigranulären Proplastide.

Sporogenese bei *Polytrichum*, Weier 1931) nimmt Dangeard (1947) an, daß die Plastidenteilungen ohne Regelmäßigkeit und ohne direkte Verbindung mit der Zytogenese verlaufen. Neuerdings konnte Strugger (1953, 1954, 1955) an Hand von Mikroaufnahmen zeigen, daß bei der Metaphase, Anaphase und Telophase die Proplastiden an den Spindelpolen verteilt sind, wodurch „eine gleichmäßige Versorgung der Tochterzellen mit Proplastiden gewährleistet ist".

Auf Grund meiner Untersuchungen liegt in meristematischen Zellen eine Ansammlung der Proplastiden um den relativ großen Kern vor. Da es sich zumeist um amyloplastische Proplastiden handelt, ist die Unterscheidung des einzelnen Proplastiden und damit die Feststellung ihrer Anzahl pro Zelle sehr schwierig. In seltenen Fällen fand ich jedoch auch stärkefreie Plastidenanlagen im Meristem. Ihre Auszählungen ergaben die niedrigsten Gesamtwerte, die überhaupt in Blattzellen von *Agapanthus* anzutreffen waren. Ich fand 14 bis 25 Proplastiden je Zelle. In den sich teilenden Zellen der meristematischen Blattzone konnte ich die gleichen Zahlen feststellen. Es ist zu beobachten, daß während der Anaphase sich die Proplastiden

annähernd gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilen (vgl. Strugger 1954).

Da es auf statistischem Wege nicht möglich ist, über die Anzahl der Proplastiden in meristematischen Zellen zuverlässige Aussagen zu machen, kann nicht entschieden werden, ob die Proplastidenteilungen parallel der Zellteilung verlaufen oder ob sie sich während der Ruhekernphase vollziehen. Da in den Zellen, die einen Ruhekern besitzen, mehr Teilungsstadien der Plastiden anzutreffen sind als in den sich teilenden Zellen, ist es wahrscheinlich, daß die Mehrzahl der Proplastidenteilungen nicht der Zellteilung parallel verläuft. Da die Meristeme der Blattbasen fortwährend Kern- und Zellteilungen durchführen und in jeder neu gebildeten Zelle etwa 20 Proplastiden anzutreffen sind, muß auf jeden Fall zur Aufrechterhaltung des embryonalen Plastidensatzes die Teilungsrate der unigranulären Proplastiden sehr hoch sein. Diese Teilungsrate ist nur auf Grund von theoretischen Überlegungen annähernd zu ermitteln, nämlich dann, wenn die Zellteilungsrate bekannt ist. Nach Küster (1951) läßt sich für massive Gewebekörper die Schnelligkeit des Mitoseablaufs nur schätzungsweise errechnen. Dagegen geben andere Autoren genaue Werte für eine ganze Zyklusdauer, d. h. Ruhekern und Mitose, an. Laughlin (1919) stellte für die Dauer der Kernteilung bei Wurzelspitzen von *Allium cepa* 97 Minuten und für die Ruheperiode 195 Minuten bei 10° C fest. Nach Reiter und Gabor (1928) beträgt die Zyklusdauer 3,5 Stunden. Marshak (1937 b) fand gleichmäßig bei *Allium*, *Pisum*, *Vicia* und *Solanum* die Dauer auf 2,5 bis 3 Stunden begrenzt. Nach diesen Literaturangaben beansprucht eine einzelne Karyokinese im Meristem mit anschließender Ruheperiode bis zum Beginn der folgenden Teilung im Höchstfall 5 Stunden. Während dieser Zeit muß sich das gesamte Plastidom der sich teilenden Zelle mindestens verdoppelt haben.

2. Die Morphologie der Teilung der multigranulären Plastiden

Bei der Ergrünung und Ausbildung der multigranulären Struktur werden die Plastiden von einer regelrechten Teilungswelle erfaßt. Dabei ist die Regel, daß im Durchschnitt fast die Hälfte der Plastiden mediane Einschnürungen aufweist. In manchen Zellen ist sogar kaum ein nicht in Teilung befindliches Plastid anzutreffen. Normalerweise wächst ein sich zur Teilung anschickendes Plastid zunächst in die Länge. Dann bildet sich in der Mittelzone eine Einschnürung, die sich beim Fortgang der Teilung vertieft, bis schließlich zwei gleich große Plastiden getrennt nebeneinander liegen. Das Plastidenstroma ist während dieser Entwicklungsphase noch amöboid. Die Grana zeigen in Profilansicht noch nicht die von Strugger (1951) beschriebene Geldrollenanordnung. Es sind erst wenige Schichten ausgebildet. Wie die quantitativen Untersuchungen ergaben, wird durch intensive Teilung dieser multigranulären Plastiden im wesentlichen die endgültige Größe der künftigen Chloroplastenzahl pro Zelle erreicht.

Während der Ablauf dieser Teilungswelle durch die Lichteinwirkung ihren Anstoß erhält, fanden die noch lebhafter sich vollziehenden Teilun-

gen der unigranulären Proplastiden im Meristem unter Lichtabschluß statt.

Bei meinen Bemühungen, an einem Objekt sämtliche Stadien der Teilung eines multigranulären Plastiden zu verfolgen, stellten sich die gleichen Schwierigkeiten ein wie bei den Versuchen, den Ablauf einer Proplastidenteilung zu beobachten. Ob die Untersuchungen in verschiedenen molaren Mono- oder Disaccharidlösungen oder in Knopscher Nährlösung mit oder ohne Zuckerzusatz vorgenommen wurden, immer machte sich an

Abb. 7. Der Beginn der Einschnürung einer multigranulären Plastide.

den Plastiden nach wenigen Stunden schon, trotz lebhafter Plasmaströmung, die Tendenz zum Rückgängigmachen der eingeschnürten Teilungsformen bemerkbar. Dieser schädigende Einfluß auf die Plastiden stellte sich in gleicher Weise ein, wenn die Schnittpräparate in der feuchten Kammer oder unter dem Deckglas, das wegen Verdunstung des Mediums mit reinem Paraffinöl umrandet war, kultiviert wurden. Gegenüber der Kultivierung der Gewebeschnitte in Leitungswasser konnte unter den aufgezeigten Bedingungen keine bessere Untersuchungsmöglichkeit festgestellt werden. Aus diesem Grunde mußten sich die Dauerbeobachtungen auf einzelne Phasen des Teilungsvollzuges an verschiedenen Objekten beschränken.

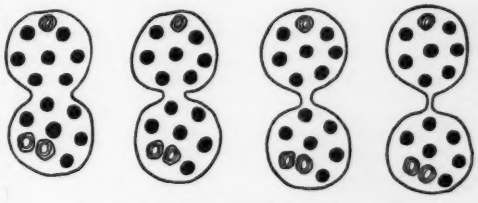


Abb. 8. Einengung des Mittelstückes.

Der Beginn einer Plastidenteilung durch Einschnürung wurde an einem bereits in der Längsrichtung gestreckten Plastid beobachtet und während 1½ Stunden die deutliche beiderseitige Einschnürung verfolgt (Abb. 7). An einem anderen Plastid gelang mir in einstündiger Beobachtung, die Einengung des Isthmus zu einem farblosen, schmalen Verbindungsstück zu sehen (Abb. 8). Im Gegensatz zu den wandernden Ansatzstellen des Verbindungsfadens bei weit fortgeschrittenen Teilungsstadien unigranulärer Proplastiden muß das Stroma bei den multigranulären Formen fester strukturiert sein, da die Lage der Tochterplastiden zueinander konstant ist. Nur ein Verkürzen und wieder Längerwerden des Fadens ist manchmal zu beobachten.

Nach Kiyohara (1932) und Kusunoki und Kawasaki (1936) tritt die letzte Phase der Plastidentrennung bei *Hydrilla verticillata* bzw. *Utricularia vulgaris* nur nachts auf. An *Agapanthus*-Plastiden wurde mehrmals das Zerreißen des verbindenden Stromafadens bei Tage beobachtet. In Abb. 9 sind die letzten Stadien einer Teilung festgehalten. In Sekundenschnelle verkürzten und verbreiterten sich die Fadenhälften und wurden ins Stroma eingezogen. In einem anderen Fall (Abb. 10) wurde das Zerreißen eines breiteren, farblosen Mittelstückes beobachtet. Auch diese farblose Substanz war nach kurzer Zeit dem Plastidenstroma einverleibt worden.

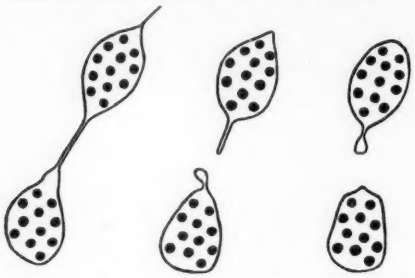


Abb. 9. Das Zerreißen des Verbindungsfadens.

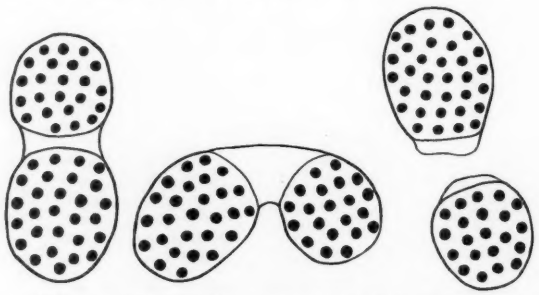


Abb. 10. Die Durchtrennung des Zwischenstückes.

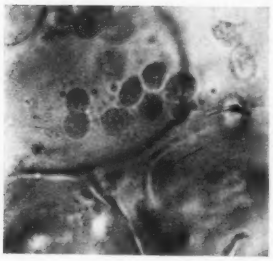


Abb. 11. Beginnende Einschnürung. Lebend, ungefärbt. Vergr. 1000×.

Abb. 12. Beginnende Zwischenzonenbildung. Lebend, ungefärbt. Vergr. 1600×.

Die weiter differenzierten Jungchloroplasten haben noch im geringen Umfange die Fähigkeit, sich zu teilen. Ihre festere Gesamtstruktur prägt sich darin aus, daß sich eine median verlaufende Ringfurche bildet

(Abb. 11), die aber bei einer mehr oder weniger tiefen Einschnürung eine farblose Stromasubstanz zwischen den beiden Tochterplastiden zurückläßt (Abb. 12), so daß immer deutlicher das granaführende Stroma von dem farblosen, granafreien Stroma abgesetzt wird (Abb. 13). Da letzteres zur Vakuolenbildung neigt, muß es von flüssigerer Konsistenz sein. Ist die

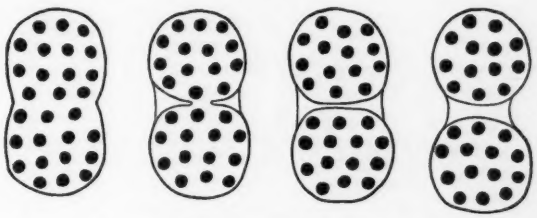


Abb. 13. Die Bildung der farblosen Zwischenzone.

Mittelzone einmal ausgebildet, so kann die Durchteilung als vollzogen betrachtet werden (Abb. 14 und 15). Bis zur endgültigen Trennung verstreicht meist geraume Zeit. Dabei wird die Mittelzone etwas in die Länge gezogen, indem sie sich verschmälert, bis sie schließlich zerreißt. Nach ihrer Durchtrennung werden allmählich die Stromafortsätze der Tochterplastiden eingezogen.

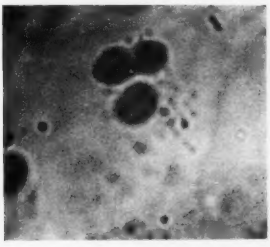


Abb. 14. Vollzogene Zwischenzonenbildung. Lebend, ungefärbt. Vergr. 1000×.

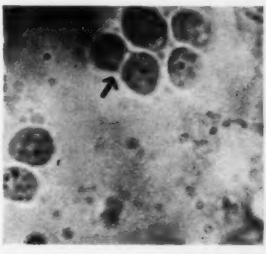


Abb. 15. Vollzogene Zwischenzonenbildung. Lebend, ungefärbt. Vergr. 1000×.

Aus diesem morphologischen Bild der Plastidenteilung läßt sich schließen, daß die Viskosität des Stromas im Laufe der Plastidenentwicklung zunimmt. Ebensowohl der Ablauf der Teilung wie die Plastidenformen weisen darauf hin, daß von den gering viskösen, amöboid beweglichen Proplastiden eine sukzessive Viskositätssteigerung des Stromas stattfindet. Es ist nicht anzunehmen, daß diese Viskositätssteigerung des Stromas das Resultat eines Wasserentzuges ist, sondern daß sie durch zunehmende Strukturierung des Stromas hervorgerufen wird. Hierfür sprechen auch die Untersuchungen Struggers (1951) und die elektronenoptischen Befunde von Cohen und Bowler (1953) und von Steinmann (1953), die eine Lamellierung des Chloroplastenstromas nachweisen konnten.

Bei den weitaus meisten Fragmentationen der Plastiden findet eine Durchschnürung in zwei gleich große Tochterplastiden statt. Von dieser Regel weichen einige der beobachteten Teilungsformen ab (Abb. 16). Bei den gelegentlich auftretenden Teilungsbildern erscheinen am häufigsten inäquale Einschnürungsstadien. Bei ihnen hat sich die Teilungsebene nicht median gebildet, sondern sich polwärts verlagert (Abb. 17). Seltener sind Plastiden auffindbar, die zwei Teilungsebenen aufweisen, also in drei Tochterplastiden zerfallen. Die Einschnürungen sind entweder gleich (Abb. 16, 2) oder ungleich weit entwickelt (Abb. 16, 3). Bemerkenswert ist, daß die Teilungsebenen nicht immer senkrecht zur Längsausdehnung des Plastiden verlaufen. An den Teilungsfiguren (Abb. 16, 3, 4 und 5) wird deutlich, daß den Einschnürungen keine bestimmte Richtung vorhergegeben ist.

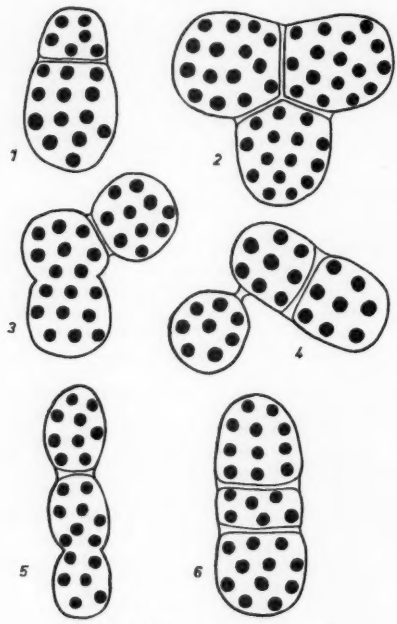


Abb. 16. Anomale Teilungsformen.

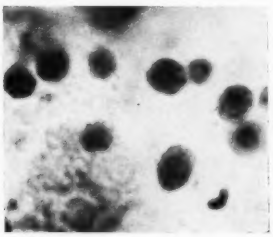


Abb. 17. Inäquale Teilung. Lebend, ungefärbt. Vergr. 1600×.

An den Chromatophoren von *Funaria hygrometrica* beobachtete Heitz (1922), an denen von *Bryopsis*-Schläuchen Küster (1937) und an den Chloroplasten in *Equisetum* Prothallien Reinhard (1933) die Zerlegung der Plastidensubstanz in drei oder mehr Portionen. Bei Monokotylen tritt nach meinen Untersuchungen in ähnlicher Weise eine „multiple Teilung der Chloroplasten" auf — wie auch Maige (1928) berichtet —, aber mehr als drei Teilgebilde konnte ich nie auffinden. Entgegen den von Haberlandt (1888) an *Selaginella* beschriebenen Plastidenketten, die durch synchrone Teilung entstanden sind, erfolgt die Teilung der Chloroplasten bei höheren Pflanzen asynchron. Die Teilungsstadien der Plastiden einer Zelle sind immer ungleich weit entwickelt.

Die Befunde von Mikosch (1877), A. Meyer (1883), Schimper (1885) und Küster (1904) sprechen für das Vorhandensein zweier

Teilungsmodi der Plastiden. „Außer diesen Chlorophyllkörnern", berichtet Mikosch, „welche sich durch den geschilderten Teilungsvorgang (Zwischenzonenbildung) vermehren, finden sich noch andere, die durch ihre Größe und schwache Konturierung sich von ersteren unterscheiden. Auch diese teilen sich, jedoch nicht durch Zurückziehung ihres Chlorophylls an zwei Pole, sondern durch gewöhnliche Einschnürung, die entweder den ganzen Querschnitt entlang oder nur einseitig erfolgt." Bei den durch ihre „Größe und schwache Konturierung" gekennzeichneten Plastiden haben Mikosch zweifellos jüngere Chloroplasten vorgelegen, die sich immer nur durch direkte Durchschnürung vermehren.

Bei der Ausbildung der farblosen Zwischenzone kommt es nicht, wie Mikosch es beschreibt, zu einer Verlagerung der chlorophyllführenden Grana an die Pole oder zu einer geradlinigen Scheidewandbildung (Nägeli 1864, Emberger 1927). Die mehr oder weniger deutliche Farblosigkeit der Mittelzone sich teilender Jungchloroplasten kommt dadurch zustande, daß nach meist anfänglicher Anlegung schmaler Ringfurchen die mittlere Stromapartie immer mehr ausgezogen wird, bis ihre Durchtrennung erreicht ist.

Die klassischen Beobachtungen der Teilungsformen der Chloroplasten werden vom Standpunkt unserer heutigen Kenntnis vom Entwicklungsgang der Plastiden in ein neues Licht gerückt. Die viel beschriebenen Teilungen der Jungchloroplasten stellen im Hinblick auf den Gesamtplastidengehalt pro Mesophyllzelle — von den Proplastidenteilungen ganz abgesehen — sicherlich nur einen geringen Anteil dar.

Die Tatsache, daß die noch amöboid veränderlichen Plastiden lebhafte Teilungen durchführen, könnte mit der Annahme eines lamellären Feinbaues der Chloroplasten (Strugger 1951, Steinmann 1953) im Einklang stehen. Während der frühen Entwicklungsphase, in der die Plastiden noch lebhafte Teilungen vollziehen, zeigen sie in Profilansicht zwar schon eine Zweischichtigkeit der Grana, aber die Reihenanordnung der Grana ist noch nicht endgültig erreicht. Die Frage bleibt aber unentschieden, wie die Teilungen der Jungchloroplasten vor sich gehen, deren Grana bereits in Geldrollen angeordnet sind. Es ist anzunehmen, daß sich die Lamellen nicht durch die farblose Zwischenzone fortsetzen, sondern daß die Zweiteilung der Lamellenstruktur auf einem jüngeren Entwicklungsstadium der Plastiden angelegt wurde, während die Fragmentation der Plastiden erst später erfolgt.

3. Die Dauer der Teilung bei multigranulären Plastiden

Da es aus aufgezeigten Gründen bei Schnittpräparaten nicht möglich ist, an einem Objekt sämtliche Stadien einer Plastidenteilung zu beobachten, kann auch die Dauer einer Zweiteilung vom Beginn der Einschnürung bis zur endgültigen Trennung nicht an einer Plastide festgestellt werden. Es soll nun der Versuch unternommen werden, auf indirektem Wege Anhaltspunkte für die Zeit zu bekommen, in der sich die Teilung eines multigranu-

lären Chloroplasten vollzieht. Dabei wurde so vorgegangen, daß für einige Zellen die Zahl der sich differenzierenden Plastiden in bestimmten Zeitabschnitten festgestellt wurde. Da dieselben ausgezählten Zellen wegen mangelnden Kultivierungsmöglichkeiten von Gewebeexplantaten nicht für die laufenden Untersuchungen herangezogen werden können, müssen die Beobachtungen stets an frischem Zellenmaterial fortgesetzt werden. Es können aber nur solche Zellen als Vergleichsmaterial verwertet werden, die zu Beginn der Versuchsreihe Plastiden gleicher Differenzierungshöhe enthielten. Außerdem dürfen nur gleich große Zellen jeweils verglichen werden, da auf Grund der im Kap. III/1 gewonnenen Erfahrung in gleich großen, benachbarten Zellen bei gleicher Differenzierungshöhe der Plastiden nahezu die gleiche Plastidenzahl vorliegt.

Als Ausgangsmaterial dieser Untersuchungen waren die etiolierten Blätter von *Agapanthus umbellatus* sehr geeignet. Bei Belichtung verläuft die Plastidenentwicklung in einem weit größeren Bezirk des etiolierten Blattes gleichartig ab als bei den normal ergrünenden Blättern. Außerdem zeigen die etiolierten Plastiden zu Beginn der Untersuchungen in einem viel breiteren Blattabschnitt gleiche Entwicklungshöhe als die normal ergrünenden Plastiden.

Bevor auf die Einzelheiten der Plastidenentwicklung und -vermehrung in zeitlicher Abhängigkeit näher eingegangen wird, sollen die Besonderheiten der Strukturausbildung und Teilungsrate der *Agapanthus*-Plastiden in der Dunkelkultur erläutert werden.

Schon Strugger (1937) beschrieb die anomale Entwicklung der Plastiden bei Etiolement, die Böing (1955) an demselben Versuchsobjekt, *Helodea*, bestätigte und vertiefte. Auch bei *Agapanthus* tritt je nach der Dauer der Dunkelkultur die Ausbildung eines mehr oder weniger vergrößerten und pigmentierten Granums im amöboiden Stroma ein. Für meine Untersuchungen war es von Interesse, ob und wieweit bei einer derartigen Unterbindung bzw. starken Verzögerung der Granavermehrung durch Lichtmangel überhaupt Durchschnürungen der Plastiden sich vollziehen und in welchem Verhältnis diese zur normalen Teilungsrate stehen.

Die zur Untersuchung gelangten Pflanzen wurden in einem Dunkelkeller bei 18 bis 20° C kultiviert. Nach 6 bis 8 Wochen hatten sich Blätter von 10 bis 20 cm Länge und 1,5 bis 2,0 cm Breite neugebildet. Die basale Zone der etiolierten Blätter war immer rein weiß, die obere Blatthälfte erschien makroskopisch gelblich, die Spitze des Blattes zeigte eine hellgrüne Färbung. Die mikroskopische Analyse brachte eine Übereinstimmung der Plastidendifferenzierung mit dieser Erscheinung (Abb. 18). Die Plastiden im basalen Blattabschnitt sind etwa $4 \times 2\ \mu$ groß. Das Stroma ist amöboid und weist oft Stärkeeinschlüsse auf. Das etiolierte Primärgranum hat einen Durchmesser von $\sim 1\ \mu$ und ist also im Vergleich zu den Angaben Strugg ers an nicht etiolierten Proplastiden (0,4 μ) wesentlich größer. Da es in geringer Menge Pigmente enthält, setzt es sich relativ deutlich vom Stroma ab. Etwa die Hälfte der etiolierten Plastiden befindet sich in Teilung, dergestalt, daß zwischen den beiden Tochtergrana das Stroma mehr oder weniger tief eingeschnürt ist (Abb. 19). Im Mittel enthält jede Zelle 30 bis 40

Plastiden. In der gelben Zone des Blattes zeigen die Primärgrana, die auf etwa 1,5 μ Durchmesser angewachsen sind, nach Beobachtungen im Hellfeld eine reichere Speicherung an Chlorophyll und besonders an Karotinoiden.

Abb. 18. Der Entwicklungsgang der Plastiden in der Dunkelkultur. Parallel dem Zerfall des primären etiolierten Granums verläuft der Rückgang der amöboiden Beweglichkeit des Stromas und eine zunehmende Vakuolenbildung.

Das Stroma ist noch amöboid und meist stärkefrei. Teilungsstadien der Plastiden finden sich noch häufig. Die Anzahl der Plastiden hat sich auf rund 30 erhöht. In der Nähe der Blattspitze setzt die Plastidenreduktion ein, ähnlich wie sie Böing (1954) an *Helodea densa* beschrieben hat. Mehr und mehr verliert das Stroma die Fähigkeit des Formwechsels und erhält allmählich ovale bis kugelförmige Gestalt. Das große primäre Granum ist in sekundäre Grana zerfallen, die tropfenförmig geworden sind und meist im Bereich des früheren Primärgranums liegen bleiben. Nur wenige wandern ins Stroma ab. In der Folge bilden sich Vakuolen im Stroma, die so groß werden können, daß die Plastide nur noch als schmale Kappe der Vakuole aufsitzt. Die durch den reichen Karotingehalt gelb erscheinenden Plastiden der letzten Differenzierungsstufe haben sich sämtlich an den senkrecht stehenden Wandungen der Zelle angesammelt. Für die Beobachtungen über die Plastidenmetamorphose bei Belichtung wurden diese degenerierten Formen nicht herangezogen. Im Endstadium der Plastidendifferenzierung in der Dunkelkultur liegen im Durchschnitt etwa 60 Plastiden pro Zelle vor. Wenn man als Ausgangszahl 25 und als Endsumme 110 Plastiden bei der normalen Plastidenentwicklung nimmt, haben sich die Plastiden pro Zelle um 85 vermehrt. Die Teilungen der Plastiden in der Dunkelkultur brachten nur rund 60 Plastiden hervor. Die Teilungsrate der Plastiden bei Etiolement ist also demnach auf ~ 41% der normalen Plastidenvermehrung herabgesetzt.

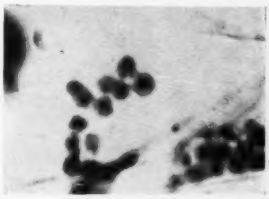


Abb. 19. Teilungsstadien etiolierter Plastiden. Mit Osmiumsäure fixiert und mit Säurefuchsin nach Altmann gefärbt. Vergr. 1400×.

Wird eine etiolierte *Agapanthus*-Pflanze dem diffusen Tageslicht ausgesetzt, so ist sie nach einem Tag makroskopisch deutlich ergrünt. Im mikro-

skopischen Bild zeigt sich in der Regel nach 4 bis 6 Stunden eine im Hellfeld wahrnehmbare Grünfärbung der Plastiden und die Bildung von Sekundärgrana im farblosen Stroma. Die Ausbildung der multigranulären Struktur bei Belichtung etiolierter Plastiden in Abständen von 24 Stunden ist in Abb. 20 dargestellt. Nach den ersten 24 Stunden der Belichtung hat das primäre Granum die Sekundärgrana ausgesondert. Die im Bereich des zerfallenen Primärgranums liegenden Grana sind besonders deutlich sichtbar.

Abb. 20. Die Ausbildung der multigranulären Struktur bei Belichtung etiolierter Plastiden in Abständen von 24 Stunden. Die unterschiedliche Granafärbung weist darauf hin, daß die Sekundärgrana, solange das Stroma amöboid veränderlich ist, noch nicht in einer Ebene auffindbar sind.

Die Umrisse der Sekundärgrana und der gesamten Plastiden sind unscharf. Die granafreien Stromabezirke zeichnen sich durch starken Formwechsel aus. Nach 2 Tagen ist das Stroma nahezu mit Grana ausgefüllt. Am folgenden Tag hat die Plastide ihre Fähigkeit zur Amöboidie fast gänzlich eingebüßt. Das primäre Granum ist meist nicht mehr sichtbar. Die unterschiedliche Färbung der Sekundärgrana in der Abb. 20 weist darauf hin, daß

Tab. 4. *Die tägliche Vermehrung belichteter, etiolierter Plastiden.* (Pla.Z. = Plastidenzahl.)

Datum	Blatt: 14,0 cm lang, 1,4 cm breit							
	Zellgröße in µ	Pla.Z.	Zellgröße in µ	Pla.Z.	Zellgröße in µ	Pla.Z.	Zellgröße in µ	Pla.Z.
2. 3.	40 × 43	23	50 × 40	26	78 × 36	29	85 × 43	27
3. 3.	43 × 35	43	63 × 50	47	73 × 43	62	73 × 57	75
4. 3.	43 × 53	58	50 × 40	56	64 × 43	73	73 × 65	96
5. 3.	50 × 34	79	50 × 50	83	57 × 43	91	73 × 36	97
6. 3.	43 × 43	81	64 × 43	92	78 × 36	96	85 × 50	107

während der ersten vier Belichtungstage die Grana noch nicht in einer Ebene sichtbar oder vielleicht verschieden dick sind. Am 5. Tag sind die Umrißformen der Plastiden deutlich vom Zytoplasma abgesetzt, und in Profilansicht ist die Anordnung der Grana in Schichten und Geldrollen gut erkennbar.

Die Schnelligkeit des Ergrünens ist abhängig von der Länge der Dunkelkultur und von dem Zustand des Materials selbst. Die Beeinflußbarkeit durch variierte Belichtungsbedingungen werden später behandelt.

Die Tabelle 4 gibt in etwa gleich großen Zellen die Plastidenzahl nach viermal 24stündiger Belichtung an. Auffallend ist die hohe Teilungsrate

gleich nach Einsetzen der Granabildung. Von den vorliegenden multigranulären Plastiden sind etwa 30% in Teilung begriffen. Nach den ersten 24 Stunden Belichtung hat sich im Durchschnitt jede Plastide einmal geteilt. Nach weiteren 24 Stunden haben die Plastiden bereits eine festere Struktur erhalten. Die auf der früheren amöboiden Entwicklungsstufe angelegten Teilungen sind teilweise durchgeführt oder liegen als verschleppte Teilungsstadien vor. Nur noch 15% der Plastiden weisen Teilungsformen auf. Nachfolgend finden noch ergänzende Teilungen statt. Nach 4 Tagen ist die endgültige Zahl nahezu erreicht. Nur ganz vereinzelt sind noch Teilungsstadien auffindbar.

Tab. 3. *Die Vermehrung der Plastiden in der belichteten, farblosen Basalzone ausgewachsener Blätter.*

Datum	Zellgröße in µ	Pla.Z.	Zellgröße in µ	Pla.Z.	Zellgröße in µ	Pla.Z.	Zellgröße in µ	Pla.Z.
27. 1.	100 × 34	28	107 × 57	31	112 × 50	32	186 × 47	26
3. 2.	107 × 39	29	100 × 57	42	112 × 59	47	143 × 60	49
17. 2.	86 × 57	35	128 × 53	62	156 × 43	48	172 × 43	49

In den stark gestreckten, etiolierten Zellen ist wegen der Hemmung der Plastidenteilungen in der Dunkelkultur das Verhältnis Zellgröße : Plastidenzahl zuungunsten der Plastidenzahl verschoben. Bei Belichtung des etiolierten Materials setzen schockartig die Plastidenteilungen ein. Daher ist der prozentuale Anteil an Teilungsstadien bei belichteten, etiolierten Plastiden größer als bei den normal ergrünenden Plastiden. Aus der Tabelle 4 geht hervor, daß die Teilung einer multigranulären noch amöboiden Plastide etwa 24 Stunden beansprucht. Die Teilungen der Jungchloroplasten vollziehen sich langsamer.

Ein anomales Verhalten in der Strukturausbildung, vor allem aber in der Teilungsrate zeigen die in der farblosen Basalzone ausgewachsener Blätter sich findenden Plastiden bei Belichtung (Tab. 3). Die Ergrünung und Sekundär-Granabildung setzen nach der gleichen Zeit ein und verlaufen in der gleichen Art wie oben beschrieben, nur die Plastidenteilungen schreiten ungemein langsam voran. Obwohl bei Beginn der Belichtung etwa 40% der Plastiden als Teilungsstadien vorlagen, haben sich nach s i e b e n Tagen kaum Durchschnürungen vollzogen. Dagegen ist das Größenwachstum normal vor sich gegangen. Die amöboide Beweglichkeit der Plastide ist erhalten geblieben, so daß die vorliegenden Plastidenformen eine unregelmäßige Gestalt besitzen. Nach weiteren 14 Tagen — wie die Tabelle angibt — sind nur noch wenige Teilungen erfolgt. Die Plastiden der farblosen, basalen Zone ausgewachsener Blätter haben durch die lange Entwicklungshemmung eine irreversible Schädigung erfahren. Die Fähigkeit zum Größenwachstum ist bei Lichteinwirkung zwar erhalten geblieben, es erfolgt aber keine normale Strukturausbildung mehr, wie an der amöboiden Formveränderlichkeit des Stromas zu erkennen ist. Ebenfalls ist der Ablauf einer intensiven Teilungswelle unterbunden.

Es ist auffallend, daß ein hoher Prozentsatz der ergrünenden Plastiden während der Ausbildung der multigranulären Struktur Vakuolenbildung zeigt. Diese finden sich im Innern des Stromas liegend oder unter der aufgewölbten Stromagrenzschicht. Daß die Vakuolen gerade im Stadium der höchsten wachstumsphysiologischen Leistung der Plastiden auftreten, läßt einen Zusammenhang zwischen der Vakuolenbildung und den erhöhten Stoffwechselprozessen der ergrünenden Plastiden vermuten. Im Verlaufe der Weiterentwicklung der Plastidenstrukturen werden die Vakuolen rückgebildet, so daß sie also kein Hindernis für die Funktionstüchtigkeit der Chloroplasten sind, wie auch Zimmermann (1893) und Schumacher (1928) feststellten.

Das Ergrünen etiolierter Blätter folgt bestimmten Gradienten. Wie Strugger (1937) und Böing (1954) an *Helodea* zeigten, verlaufen diese von der Blattspitze zur Basis und vom Blattrand zur Mittelrippe. Bei *Agapanthus* ist der gleiche Gradientenverlauf makroskopisch sehr gut festzustellen. Mikroskopisch ist außerdem zu beobachten, daß die Ergrünung von den einzelnen Blattnerven ins Mesophyll hinein sich fortsetzt und zuerst um die Stomata erfolgt. Daraus kann auf eine Beziehung zwischen dem Ergrünungsprozeß und der Stoffleitung geschlossen werden. Als Beitrag zu dieser Frage möchte ich folgende Beobachtung über den Verlauf des Ergrünungsgradienten bei einer teilweisen Unterbrechung der Leitbündelbahnen an etiolierten *Agapanthus*-Blättern anführen: Wird bei ergrünenden Blättern vom Blattrand einwärts das Blattgewebe durchschnitten, so zeigt es sich immer, daß nach der Verkorkung des verletzten Gewebes der basipetale Wundrand kräftiger ergrünt und hier die Plastiden eine höhere Differenzierungsstufe erreicht haben als diejenigen der übrigen Blattpartien. Diese Tatsache weist darauf hin, daß für die Plastidenentwicklung irgendwelche Stoffe, die in den Leitbündeln von der Blattbasis zur Blattspitze wandern, maßgeblich sind, da diese am unteren Wundrand gestaut werden. — In der Literatur finden sich Angaben, die ebenfalls auf eine Beziehung zwischen Ergrünen und Stoffleitung hinweisen. Zu dieser Annahme führten die Beobachtungen von Lopriore (1904), da er bei den Kotyledonen von *Vicia Faba* und von *Eriobotrya japonica* einen „Saum von grünen oder gelben Körnern" um die ersten Spiralgefäße des Leitungssystems im farblosen Parenchym sah. Schwarz (1928) führt die Entstehung der geaderten Panaschierung auf Stoffe zurück, die in den Gefäßbündeln gebildet werden. Daß auch der Abbau der Plastidensubstanz einen Zusammenhang mit den Leitungsbahnen der Pflanze zeigt, stellte Küster (1911, 1925) fest. Er beobachtete, daß das herbstliche Vergilben bei vollkommener oder unvollkommener Unterbrechung der Blattnerven in den betroffenen Anteilen der Blattspreite aufgehalten wird. Aus diesen Beobachtungstatsachen kann gefolgert werden, daß der Aufbau sowohl wie der Abbau der Chloroplastenstruktur und Pigmente von Stoffen gesteuert werden, die in den Leitbündeln sich finden. Durch die eigenen Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß diese Stoffe bei dem Ergrünungsprozeß von der Blattbasis zur Spitze wandern. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben,

eine lokale Anreicherung der verantwortlichen Stoffe durch Unterbrechung der Blattnerven herbeizuführen.

V. Der Einfluß des Lichtes auf die Ausbildung der Struktur und die Teilungsrate der Plastiden

1. Die Wirkung verschiedener Lichtintensitäten

Bei den Ergrünungsversuchen an etiolierten Plastiden im Tageslicht zeigte sich eine Abhängigkeit der Strukturausbildung von der Belichtungsintensität. Zur näheren Kenntnis dieser Beziehung und der eventuellen Beeinflussung der Teilungsrate wurden etiolierte *Agapanthus*-Pflanzen unter der Einwirkung von 500, 2000, 10.000, 15.000 und 20.000 Lux zur Entwicklung gebracht. Die Versuche wurden in einem Lichtkasten bei konstanter Temperatur von 24° C vorgenommen. Als Lichtquelle diente eine wassergekühlte 500-Watt-Glühbirne (Philips), deren relative spektrale Energieverteilung dem Spektrum eines Glühkörpers von 950° K entspricht. Die verschiedenen Lichtintensitäten wurden durch Variation des Abstandes der zu belichtenden Pflanze von der Lichtquelle erzielt. Mit Hilfe einer Selenphotozelle konnte die Entfernung der Pflanze von der Lichtquelle so eingestellt werden, daß die Intensitätsstufen 2000, 10.000, 15.000 oder 20.000 Lux verwirklicht waren. Die Stufe von 500 Lux wurde durch Zwischenschalten einer Milchglasscheibe erreicht.

Die zur Untersuchung gelangten Pflanzen waren 4 bis 6 Wochen in einem Dunkelraum bei 18 bis 20° C kultiviert worden und hatten etwa 8 cm lange Blätter entwickelt. Bei den Belichtungsversuchen waren die etiolierten Blätter an der Pflanze belassen.

Ein normales Ergrünen erfolgte bei der Einwirkung von 500 und 2000 Lux. Die Strukturausbildung und die Teilungsrate unterschieden sich nicht merklich von den Befunden der im diffusen Tageslicht ergrünten Pflanzen. Die mikroskopische Analyse der bei 10.000 Lux ergrünten Plastiden zeigte anfänglich eine normale Plastidenentwicklung. In der Größe der gebildeten Sekundärgrana lag allerdings ein erkennbarer Unterschied vor. Bereits Strugger sprach 1937 die Vermutung aus, daß wahrscheinlich die Lichtintensität ausschlaggebend für die Größe der sich bei Belichtung aus dem etiolierten Primärgranum bildenden Sekundärgrana ist. Tatsächlich zerfällt bei 500 Lux das primäre Granum in deutlich größere Sekundärgrana (0,5—0,6 μ Durchmesser) als bei 10.000 Lux (0,2 μ Durchmesser). Bei der Ergrünung in 10.000 Lux setzten immer nach 3 bis 4 Tagen pathologische Veränderungen der Plastiden ein. Es erfolgte keine zunehmende Bildung der grünen Chlorophyllpigmente, sondern es blieben die gelben Komponenten weiterhin sichtbar. Anstatt des Vakuolenrückgangs, der für diesen Entwicklungszustand der Plastiden typisch ist, nahm ihre Bildung zu, derart, daß am 6. Belichtungstag nahezu jedes Plastid vakuolisiert war. Gleichzeitig begaben sich die Plastiden mehr und mehr in Lichtschutzstellung („Parastrophe" nach Senn, 1917), so daß kaum eine einzige Plastide in Flächenstellung zu sehen war. Eine bevorzugte Zusammenballung wurde

um den Kern und an den Zellwandungen, die an Interzellularräume grenzen, sichtbar. Auffallend ist ferner, daß die sich bei hoher Lichtintensität entwickelnden Chloroplasten eine zunehmende Vergrößerung in der Flächenausdehnung erfuhren und daß die Größenunterschiede der in einer Zelle auftretenden Plastiden erheblicher waren als bei der normalen Entwicklung.

Wurden die etiolierten *Agapanthus*-Pflanzen der noch intensiveren Lichteinwirkung von 20.000 Lux ausgesetzt, so traten die hier aufgezeigten Anomalien noch deutlicher hervor. Schon nach 24stündiger Bestrahlung wurden die ersten Degenerationserscheinungen an den Plastiden deutlich. Die Vakuolenbildung setzte ein, und das Stroma war so dünn ausgezogen, daß seine Lichtbrechung kaum eine andere als die des Zytoplasmas war. Am 2. Belichtungstag befanden sich die stark vakuolisierten Plastiden fast sämtlich in Parastrophe, in der sie nicht mehr auszählbar sind. Das primäre Granum war in sehr kleine Grana zerfallen. Da die Pigmentbildung derartig gering ist, hoben sich die Grana kaum vom Stroma ab.

Der schädigende Einfluß auf die Strukturausbildung und Chlorophyllsynthese durch die Einwirkung hoher Lichtintensitäten wurde unter Beibehaltung der vollen Vitalität der Zellen hervorgerufen. Der Kern und das Zytoplasma zeigten normales Aussehen, die Plasmolysierbarkeit war erhalten geblieben. Bei der Einwirkung hoher Lichtintensitäten — von 10.000 Lux aufwärts — traten nach einigen Tagen auch makroskopisch sichtbare Schädigungen des Blattes ein. Die Blattspreite zeigte eine mehr oder weniger starke Scheckung in hellgrüne und gelbliche Flecken. Die Tatsache, daß einige Blätter in ihrer basalen Region, genau dort, wo bei der Belichtung ein jüngeres Blättchen vor dem starken Lichteinfall schützend gelegen hatte, normales Ergrünen zeigte, wies eindeutig darauf hin, daß die intensive Bestrahlung die einzige Ursache dieser Schädigung war.

Nach dem Aussetzen der bestrahlten Pflanze ins Gewächshaus trat die grün-gelbe Scheckung des Blattes noch deutlicher hervor. Im ganzen war das Blatt schlaffer als ein normal ergrüntes Blatt, da die ausgebleichten Zellen eine geringere Turgeszenz aufwiesen. Die mikroskopische Untersuchung ergab ferner, daß grüne Zellkomplexe mit farblosen Arealen abwechselten. Die Ausdehnung dieser grünen bzw. farblosen Zellverbände variierte sehr: Es konnten nur eine oder zwei grüne Zellen von farblosen eingeschlossen oder umgekehrt wenige farblose von vielen grünen Zellen umgeben sein. Dieser beschriebene Zustand der stark bestrahlten Blätter blieb bei normalen Lichtverhältnissen etwa 6 bis 10 Wochen bis zum Einsetzen der Blattvergilbung erhalten.

In den grünen Zellen war die Strukturausbildung der Plastiden und die Chlorophyllsynthese normal vor sich gegangen. Dagegen lagen in den ausgebleichten Zellen nur geschädigte Plastiden vor, deren Grana- und Pigmentbildung weitgehend gestört war. In dem amöboid beweglichen Stroma fanden sich vielfach Vakuolen.

In der Übergangszone zwischen den kräftig grünen und den farblosen Zellkomplexen zeigten die Plastiden eine sehr unterschiedliche Struktur-

ausbildung. Die Mehrzahl der Chloroplasten war erheblich größer als normal entwickelte *Agapanthus*-Chloroplasten. Diese Vergrößerung war durch gesteigertes Flächenwachstum vor sich gegangen, da in Profilansicht keine entsprechende Dickenzunahme festgestellt wurde. Die geldrollenartige Anordnung der Grana war in diesen großen Chloroplasten oft gut zu sehen.

Die Größenunterschiede können beim Vergleich der Chloroplasten eines unbestrahlten mit einem bestrahlten Blattabschnitt ein und desselben Blattes besonders überzeugend dargestellt werden. Zu diesem Versuch wurde eine etiolierte *Agapanthus*-Pflanze 48 Stunden mit 15.000 Lux bestrahlt. Ein Teil eines Blattes war während der Bestrahlung durch eine ringförmige

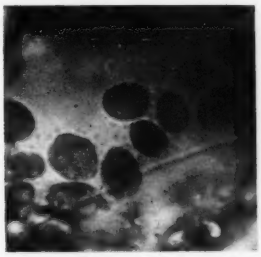


Abb. 21 *a*.

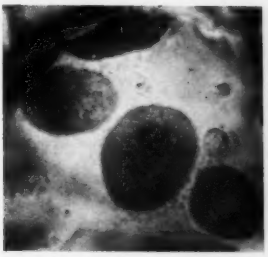


Abb. 21 *b*.

Abb. 21. Die Größenunterschiede der Chloroplasten ein und desselben Blattes nach 48stündiger Bestrahlung mit 15.000 Lux. *a* unbestrahlter Blattabschnitt. Lebend, ungefärbt. Vergr. 1000×. *b* bestrahlter Blattabschnitt. Lebend, ungefärbt. Vergr. 1000×.

Manschette vor Exposition geschützt. Nach dieser Bestrahlungsbehandlung wurde die Pflanze für 3 Wochen normaler Tagesbelichtung im Gewächshaus ausgesetzt. Nach dieser Zeit zeigten sich zwischen den Chloroplasten der bestrahlten und unbestrahlten Blattabschnitte charakteristische Unterschiede (Abb. 21 *a*, *b*). Dieser Befund ergibt, daß eine einmalige sehr starke Bestrahlung das Gefüge der noch amöboiden etiolierten Plastiden irreversibel zu verändern scheint und Formänderungen determiniert, die sich auch nach längerer Normalbelichtung nicht wieder ausgleichen.

Neben diesen Riesenformen, die eine Größe bis zu $24 \times 12\,\mu$ erreichen können, waren in einer Zelle alle Übergänge bis zu sehr kleinen Chloroplasten von $2{,}0\,\mu$ zu finden. Außerdem kamen in derselben Zelle reduzierte, farblose Plastiden mannigfaltiger Ausbildung vor. In Abb. 22 sind die in einer Zelle nebeneinander vorkommenden Plastidenformen dargestellt (vgl. auch Abb. 21 *b*).

Die Anzahl der Chloroplasten in der Übergangszone von den farblosen zu den grünen Zellkomplexen ist sehr unterschiedlich. In gleich großen Zellen konnten 1 bis 45 Chloroplasten ausgezählt werden. In der Regel waren in den Zellen mit geringer Chloroplastenzahl meist besonders große Chloroplasten zu finden, die sich durch die ganze Zelle erstrecken konnten und oft noch an den Seitenwänden emporreichten.

Bei der Untersuchung der verschiedenen Ausbildungsformen durch Lichtstrahlung geschädigter Chloroplasten sind zwischen den extrem großen grünen Formen bis zu kleinen farblosen Degenerationsformen alle Übergänge feststellbar. Als offensichtlich weniger stark geschädigte Stadien erschienen Chloroplasten, die sich flächenhaft vergrößert hatten, aber noch leicht amöboid beweglich geblieben waren. In Stadien, die ich für stärker geschädigt halte, hatte die Ausbildung der Sekundärgrana abgenommen, wobei aber die Granagröße zugenommen hatte. In Profilansicht zeigten diese Formen nur wenige Granaschichten. Als besonders stark geschädigte Formen erschienen Plastiden, die nur noch einzelne deutlich pigmentierte

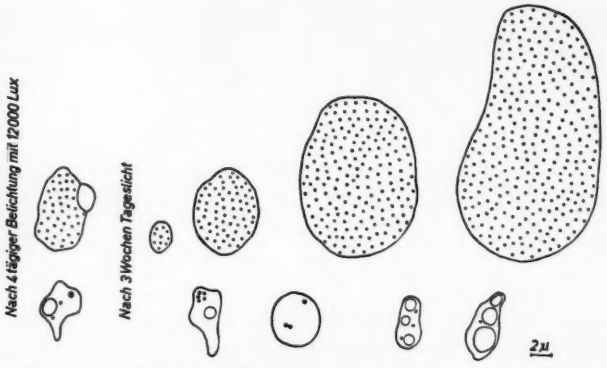


Abb. 22. Die in einer Zelle nebeneinander vorkommenden Plastidenformen nach Bestrahlung mit hohen Lichtintensitäten.

Grana in einem weit ausgespannten farblosen Stroma aufwiesen. In einer wahrscheinlichen höchsten Stufe der Plastidenschädigung durch hohe Lichtintensitäten kann von einem Entwicklungsstillstand der Plastiden gesprochen werden, da in diesen Formen nur schwer Grana auffindbar waren, wie auch ein Gehalt an Assimilationspigmenten im Hellfeldmikroskop nicht mehr nachweisbar war.

Um einige quantitative Aufschlüsse über diese Bedingungen zu erhalten, interessiert nun, wie lange eine etiolierte *Agapanthus*-Pflanze intensiv bestrahlt werden muß, bis die aufgezeigten Degenerationserscheinungen der Plastiden entstehen. Zur Untersuchung dieser Frage wurden die Versuchspflanzen im Lichtthermostaten bei einer Temperatur von 24° C 12, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden einer Belichtungsintensität von 15.000 Lux ausgesetzt. — Nach 12 Stunden Belichtung waren die gelb-grünen, amöboiden Plastiden meist vakuolisiert und an den parallel zum Lichteinfall stehenden Zellwandungen angesammelt. Die Sekundärgrana waren bereits gebildet, das primäre Granum war noch sichtbar. Erst nach fünftägigem Tageslicht waren die Chloroplasten regelmäßig in der Zelle verteilt. Die Granastruktur war bei allen Plastiden normal entwickelt. Auch bei späteren Kontrollen lagen bei dieser Pflanze k e i n e reduzierten Plastidenformen

vor. — Nach einer 24stündigen intensiven Bestrahlung befanden sich die Plastiden fast sämtlich in Parastrophe. Die unterschiedliche Differenzierung von ergrünenden und bereits geschädigten Plastiden war erkennbar: Neben hellgrünen, noch amöboiden Plastiden, deren gesamtes Stroma mit sehr kleinen, schwach sichtbaren Sekundärgrana angefüllt war, fanden sich solche, die mindestens ebenso veränderlich waren, aber deutlich einige pigmentierte Grana im farblosen Stroma zeigten. Nach 5 Tagen normaler Belichtung lagen noch amöboidform-veränderliche Plastiden vor, die gleichmäßig im Zytoplasma verteilt waren. Vereinzelte reduzierte Plastidenformen, deren Stroma sehr dünn ausgezogen war, kamen in mehreren Zellen vor. Es traten Größenunterschiede der Chloroplasten von 3,5 μ bis zu 10,5 μ auf. — Nach 48stündiger starker Bestrahlung und anschließendem fünftägigem normalem Lichtgenuß waren in vielen Zellen degenerierte Plastidenformen neben hellgrünen Chloroplasten auffindbar. Die Chloroplasten hatten maximal eine Größe von $10 \times 6\ \mu$ erreicht. Innerhalb einer weiteren Woche hatten sich die Chloroplasten bis zu $12 \times 8{,}6\ \mu$ im Maximum und zu $3 \times 1{,}5\ \mu$ im Minimum entwickelt. Die reduzierten Plastiden dagegen waren im Mittel nur $2{,}1 \times 1{,}4\ \mu$ groß. Nach weiteren zwei Wochen war der Größenunterschied der vorliegenden Chloroplasten noch beträchtlicher. Ich maß Plastidendurchmesser von 2,5 bis 15,0 μ. — Am Ende einer 72stündigen intensiven Bestrahlung lagen die vakuolisierten gelb-grünen Plastiden wiederum dem Licht abgewandt, in Parastrophe, vor. War die Pflanze daraufhin 5 Tage lang normalem Tageslicht ausgesetzt worden, befanden sich die teilweise noch vakuolisierten Plastiden in regulärer Verteilung in der Zelle. In sehr vielen Zellen waren farblose reduzierte Plastiden zu finden, jedoch ganz farblose Mesophyllzellen waren nicht ausgebildet worden. In der Folgezeit entwickelten sich in den Mischzellen die Chloroplasten zu den bereits beschriebenen, sehr unterschiedlich großen Formen. — Wurden die etiolierten Pflanzen 96 oder 120 Stunden mit 15.000 Lux belichtet, zeigten die Versuchsergebnisse keine wesentlichen Veränderungen in der Strukturausbildung der Plastiden gegenüber dem kürzere Zeit bestrahlten Material. Doch war bei diesen Pflanzen schon makroskopisch auf der Blattspreite ein Mosaik von gelblichen und grünen Flecken zu erkennen. Die mikroskopische Analyse nach der vorgenommenen Belichtung ergab, daß fast alle Plastiden sich in Parastrophe befanden. Die Chloroplasten hatten im Durchschnitt eine Größe von $7 \times 5\ \mu$ erreicht und ließen sehr kleine Grana erkennen. In anderen Zellen waren nur reduzierte Plastiden auffindbar, die meist vakuolisiert waren.

Diese Versuche ergeben also, daß eine 12stündige Belichtung von 15.000 Lux nicht ausreichte, um eine Schädigung der Strukturausbildung der Plastiden herbeizuführen. Nach 24 Stunden traten in einigen, nach 48 Stunden in vielen und nach 72 Stunden Belichtung in sehr vielen Zellen reduzierte Plastidenformen auf. Bei einer 96stündigen Belichtung mit 15.000 Lux war bereits die Schädigung der Plastiden so stark, daß ganze Zellkomplexe ausgebleicht wurden und eine makroskopisch sichtbare Scheckung der Blattfläche eintrat.

Die Beobachtungen über die Strukturausbildung etiolierter Plastiden unter der Einwirkung verschieden starken weißen Lichtes haben gezeigt, daß eine reziproke Abhängigkeit der Granagröße von der Lichtintensität besteht. Bei einer Lichtstärke von 500 Lux bildeten sich aus dem Primärgranum Sekundärgrana, die einen Durchmesser von 0,5 bis 0,6 μ aufwiesen. Die unter dem Einfluß von 10.000 Lux ausgesonderten Sekundärgrana besaßen nur einen Durchmesser von etwa 0,2 μ. Dagegen lag die Größe der bei einer Lichtstrahlung von 20.000 Lux entstandenen Sekundärgrana an der Grenze der mikroskopischen Auflösbarkeit. Durch dieses Ergebnis findet die von Strugger (1937) beschriebene „Labilität des Zerteilungsgrades der Granasubstanz" und die Unterschiedlichkeit in der Größe der Grana, auf die Heitz (1936) und Grave (1954) hinwiesen, eine Erklärung.

In den eigenen Versuchen vollzogen die Plastiden eine der normalen Plastidenmetamorphose entsprechende Differenzierung und Vermehrung bei 500 und 2000 Lux. Da bei dem Wachstum der Monokotylenblätter die Plastiden erst ganz allmählich dem Lichtgenuß ausgesetzt werden, wird möglicherweise der relativ niedrige Lichtanspruch für die Plastidenentwicklung genetisch festgelegt sein. In physiologischer Hinsicht findet das aufgezeigte Ergebnis eine Übereinstimmung mit den Befunden von Sachs (1862) und neuerdings von Schleep (1955), die bei der Ergrünung etiolierter Gramineenkeimlinge das Optimum der Chlorophyllbildung bei schwachem Licht feststellten.

Bei einer intensiven Bestrahlung von 10.000 Lux und mehr traten degenerative Veränderungen der *Agapanthus*-Plastiden ein. Unter Beibehaltung der vollen Vitalität der Zellen wurde die Ausbildung der Plastidenstruktur durch eine allzu intensive Bestrahlung gestört oder sogar unterbunden. Eingehende Untersuchungen ergaben, daß von einer 24stündigen Lichteinwirkung von 10.000 Lux an aufwärts die irreversible Schädigung der Plastiden proportional der Bestrahlungsdauer und -intensität zunimmt. Damit zeigt sich die Plastidenstruktur offensichtlich als trefferabhängig (Timoféeff-Ressovski und Zimmer 1947).

Bemerkenswert ist, daß unter diesen anomalen Bedingungen der Chloroplast zu einem starken Flächenwachstum befähigt wird, zu dem seine Dickenzunahme in keinem Verhältnis steht. Daneben treten Zwergplastiden auf, so daß die vorliegenden Chloroplasten erhebliche Größenunterschiede aufweisen. Das erste Stadium der Plastidenschädigung durch hohe Lichtintensitäten scheint die Erhaltung der amöboiden Beweglichkeit zu sein. In der Folge wird das Plastidenstroma mehr und mehr ausgezogen und immer formveränderlicher. Schließlich macht sich ein fortschreitender Chlorophyll- und Granaschwund sowie eine zunehmende Stromareduktion bemerkbar, bis endlich die vakuolige Degeneration beginnt.

Dieses Bild der Plastidenschädigung als Folge intensiver Lichtstrahlung stimmt mit den Erfahrungen über Plastidendegenerationen, die Knudsen (1940) mittels Röntgenstrahlen, Schumacher (1928) auf Grund von Kälteeinwirkung und Lärz (1942) durch Rubidiumchloridwirkung machten, überein. Schumacher stellte durch Temperaturerhöhung bei der

Ergrünung unterkühlter Blätter von *Brassica oleracea* ebenfalls beträchtliche Schwankungen in der Größe und in der Pigmentbildung — auch innerhalb einer Zelle — fest. Knudsen beobachtete ähnliche durch Röntgen-Strahlung bedingte irreversible Änderungen der Plastidenformen. Bei der Einwirkung von Rubidiumchlorid (0,01 Mol) wies Lärz Störungen der Plastidenteilungen nach. Dadurch traten auch starke Unterschiede in der Größe und in der Zahl der Chloroplasten pro Zelle auf.

Nach dem vorliegenden Ergebnis muß unter dem Einfluß hoher Lichtintensitäten die submikroskopische Struktur der Plastiden geschädigt werden. Das reziproke Verhältnis zwischen Chloroplastenzahl und Chloroplastengröße in der beschriebenen Übergangszone machen folgende Annahme wahrscheinlich: Die hohe Trefferzahl intensiven und energiereichen Lichtes zerstört das Gefüge vieler Chloroplasten. Der Zustand der Chloroplasten war bereits so weit differenziert, daß bei den Überlebenden weitere Teilung nicht mehr möglich ist. Der Überschuß an spezifischen Aufbaustoffen im Plasma provoziert nun die Ausbildung von Riesenformen durch laufende Reduplikation der noch teilungsfähigen Grana und durch Stromawachstum. Sind jedoch auch die Grana nicht mehr reduplikationsfähig, so entnehmen die wenigen, die zufällig die Bestrahlung überstanden haben, die gesamte zur Verfügung stehende Aufbausubstanz, um sie in das eine überlebende Gefüge einzubauen. Diese Verhältnisse demonstrieren ausgezeichnet, daß die Chloroplasten gesetzmäßig strukturierte Zellelemente sind, deren Entstehung *de novo* selbst bei günstigstem Materialangebot nach Abschluß ihrer Teilungsfähigkeit nicht erwartet werden darf.

2. Die Wirkung von kurz- und langwelligem Licht

Zu den im vorigen Kapitel geschilderten Untersuchungen wurde eine künstliche Lichtquelle (Glühbirne) benutzt. Da ihr Licht einen großen Anteil an langwelligen roten Strahlen und bedeutend weniger an blauen Strahlen besitzt, ist es möglich, daß neben den gefundenen Strukturunterschieden, die von der Lichtquantität abhängig waren, auch eine spezifische Plastidendifferenzierung unter verschiedener Lichtqualität vor sich gegangen ist. Die bisher in der Literatur dargestellten Versuche über die Wirkung verschiedener Wellenlängen auf die Plastiden sind vornehmlich physiologischer Art. Der Hauptwert wurde auf die Bildung und Beständigkeit des Chlorophylls gelegt (Reinke 1893, Schanz 1919, Schürhoff 1924, Rudolph 1934, Montfort und Zöllner 1942, Egle 1944, Montfort 1953 u. a.). Die Wirkung des kurz- und langwelligen Lichtes auf die Strukturausbildung der Plastiden aber ist dabei nicht beachtet worden.

Zur Verwendung gelangten die Farbfilter der Firma Schott & Gen. RG 1 und BG 12. Das hellrote Filter RG 1 läßt nur das langwellige Licht oberhalb 650 mμ passieren. Die Hauptdurchlässigkeit liegt im ultraroten Bereich. Das Maximum des Blaufilters BG 12 liegt um 400 mμ und im Ultrarot. In der Versuchsanordnung befanden sich die benutzten Filter in einer Schablone zwischen dem Lichtthermostaten und der Kühlküvette mit

der Lichtquelle von 500 Watt. Die Versuchspflanzen waren 12 cm vom Farbfilter entfernt. Bei weißem Licht betrug in diesem Abstand die Lichtstärke 10.000 Lux. Die etiolierten *Agapanthus*-Pflanzen wurden bei einer Temperatur von 22 bis 24° C bestrahlt. Die relative Leistung der durchgelassenen Energie der Lichtfilter wurde auf thermoelektrischem Wege gemessen. Eine Thermosäule, die mit einem empfindlichen Galvanometer verbunden war, wurde mit dem zu untersuchenden Licht bestrahlt und der Galvanometerausschlag abgelesen. Blau : Rot : Weiß standen in einem angenäherten Verhältnis wie 1 : 15 : 18.

Bei der Bestrahlung der etiolierten *Agapanthus*-Blätter mit lang- bzw. mit kurzwelligem Licht traten schon nach 24 Stunden deutlich feststellbare Unterschiede in der Strukturausbildung ein (Abb. 23). Obwohl makro- und mikroskopisch die Blättchen bzw. die Plastiden in beiden Versuchen gleich ergrünt waren, zeigten die Blaulicht-Plastiden immer einen höheren Differenzierungsgrad als die unter Rotlicht zur Entwicklung gelangten Plastiden. In beiden Fällen war das Primärgranum in Sekundärgrana zerfallen. Unter dem langwelligen Licht blieb das primäre Granum als deutlich ergrüntes Gebilde sichtbar, während die auftretenden Sekundärgrana kaum kenntlich waren. Dagegen war bei den Blaulicht-Plastiden zwar das primäre Granum noch auffindbar, aber die Sekundärgrana waren an Zahl reicher vorhanden, und die Grana wie auch das gesamte Plastid zeigten klarere Umrisse. Einer Granagröße von etwa 0,2 μ Durchmesser im Blaulicht standen die Rotlichtgrana mit 0,4 bis 0,5 μ Durchmesser gegenüber. Unter den Rotlicht-Plastiden fanden sich meist langgezogene, amöboide Teilungsformen. Dagegen hatten die Teilungsstadien der Blaulicht-Plastiden kompaktere Formen, obwohl sie noch granafreie Stromapartien besaßen, die amöboid beweglich waren.

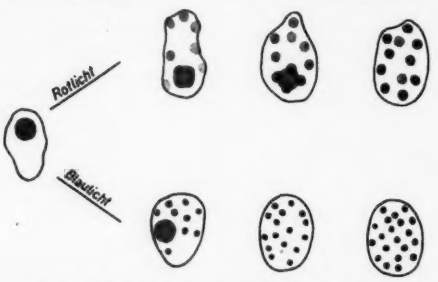


Abb. 23. Einwirkung von Rot- und Blaulicht auf etiolierte Plastiden in Abständen von 24 Stunden.

Nach 48stündiger Bestrahlung hatte in beiden Versuchsblättern die Pigmentsynthese deutlich zugenommen. Das Stroma der Blaulicht-Plastiden war mit Grana angefüllt und war kaum noch amöboid veränderlich. In einigen Plastiden konnte das primäre Granum noch aufgefunden werden, andere wiesen in Profilansicht bereits vier bis fünf Granaschichten auf. Dagegen wurde in den Rotlicht-Plastiden meist noch das Primärgranum nachgewiesen. Im Vergleich mit den Blaulicht-Plastiden zeigten die unter rotem Licht sich differenzierenden Plastiden viel unregelmäßigere Formen.

Während der weiteren Differenzierung glichen sich die Rotlicht-Plastiden in ihrer Gestalt, Granagröße und amöboiden Beweglichkeit immer

mehr den Blaulicht-Plastiden an. Jedoch zeigten die unter Blaulicht ausgebildeten Chloroplasten in einigen Fällen nach vier oder fünf Tagen Bestrahlung Degenerationserscheinungen. Die gelb-grünen Plastiden hatten sich mehr oder weniger in Parastrophe begeben. Die Umrißformen der Plastiden wurden undeutlich.

Beim Rotlichtmaterial konnte an längeren, etiolierten Blättern, die von der Einwirkung der langwelligen Strahlen entfernter waren, festgestellt werden, daß sie unregelmäßig geformte Chloroplasten besaßen. Die Anordnung der Grana, die einen Durchmesser von 0,5 bis 0,6 μ hatten, war äußerst labil. Durch geringfügige mechanische Schädigung kippten die Grana. Die Teilungsbilder dieses Materials zeigten nach fünf- bis sechstägiger Rotlichtbestrahlung hauptsächlich Einschnürungsstadien, während die entsprechenden Blaulicht-Plastiden nur Zwischenzonenbildung beim Teilungsvorgang aufwiesen.

Die Tabellen 6 und 7 sprechen nicht dafür, daß die Teilungsrate der Plastiden durch kurz- oder langwellige Strahlen beeinflußt wird. Nur scheint das Blaulicht nach einiger Zeit eine schädigende Wirkung auf die Strukturausbildung der Plastiden zu haben, wodurch die Teilungsfähigkeit gehemmt wird. Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß der Grad der Schädigung individuellen Schwankungen unterworfen ist. Hier sind wohl Unterschiede in der wachstumsphysiologischen Leistungsfähigkeit der etiolierten Pflanze maßgebend.

Tab. 6. *Die tägliche Vermehrung der Rotlicht-Plastiden.*

Datum	Blatt: 11,0 cm lang, 1,5 cm breit. Rotfilter RG 1							
	Zellgröße in μ	Pla.Z.	Zellgröße in μ	Pla.Z.	Zellgröße in μ	Pla.Z.	Zellgröße in μ	Pla.Z.
26. 5.	47 × 30	35	53 × 29	37	43 × 39	41	57 × 47	52
27. 5.	39 × 39	57	43 × 39	63	50 × 39	56	54 × 46	75
28. 5.	49 × 33	78	54 × 34	83	56 × 39	84	50 × 42	97
29. 5.	44 × 33	102	46 × 30	107	42 × 39	110	46 × 46	113
30. 5.	44 × 29	98	50 × 37	111	56 × 36	117	57 × 39	113

Tab. 7. *Die tägliche Vermehrung der Blaulicht-Plastiden.*

Datum	Blatt: 11,0 cm lang, 1,5 cm breit. Blaufilter BG 12							
	Zellgröße in μ	Pla.Z.	Zellgröße in μ	Pla.Z.	Zellgröße in μ	Pla.Z.	Zellgröße in μ	Pla.Z.
26. 5.	43 × 36	38	54 × 42	41	49 × 38	44	60 × 42	54
27. 5.	43 × 36	56	54 × 37	62	49 × 38	61	52 × 39	60
28. 5.	39 × 36	65	42 × 37	73	42 × 39	72	53 × 37	83
29. 5.[1]	43 × 37	66	44 × 39	81	46 × 33	79	53 × 39	89
30. 5.	47 × 32	69	44 × 34	77	39 × 43	94	50 × 42	97

[1] Beginn der Plastidendegeneration.

Pyrkosch (1936) wies nach, daß der kurzwelligen Hälfte des Sonnenspektrums bei bestimmten photophysiologischen Prozessen eine größere Bedeutung zukommt als dem langwelligen Anteil. Bei Prüfungen des Empfindlichkeitsgrades von Schließzellen stellte Pyrkosch fest, daß selbst bei einem Energieverhältnis des roten zum blauen Licht von 200 : 1 das kurzwellige Licht größere Photoeffekte im Sinne der Öffnungsreaktion auslöst! Mit diesem Ergebnis stehen die eigenen Beobachtungen in voller Übereinstimmung. Auch für die Strukturausbildung etiolierter Plastiden besitzt das Blaulicht eine größere Wirksamkeit als das Rotlicht. Bei einer 15fachen Energiedurchlässigkeit des Rotfilters RG 1 (Schott) gegenüber dem Blaufilter BG 12 (Schott) finden sich beim Blaulichtmaterial eine intensivere Granateilung und stärkerer Rückgang der amöboiden Beweglichkeit als bei den Rotlicht-Plastiden. Der Grund für die lebhafte Granabildung unter Blaulicht könnte in einem stärkeren Absorptionsvermögen im kurzwelligen Spektralbereich der für die Granateilung verantwortlichen Proteide zu suchen sein. Dementsprechend sind die spezifischen Absorptionsmaxima derjenigen Elementarbestandteile, die die Teilungen bedingen, im blauen oder ultravioletten Bereich zu suchen.

VI. Zusammenfassung

1. Durch eine statistische Untersuchung der Plastidenanzahl in den Zellen verschiedener Zonen junger, im Wachstum befindlicher Blätter von *Agapanthus umbellatus* wurde erwiesen, daß die Vermehrung der Plastiden ausschließlich während ihrer Metamorphose erfolgt. Die Untersuchungen ergaben ferner, daß die Proplastidenzahl jeder neugebildeten meristematischen Zelle stets etwa 20 beträgt. Infolgedessen muß unter Berücksichtigung der aus der Literatur bekannten durchschnittlichen Zyklusdauer von Zellteilungen die Teilungsrate der Proplastiden im meristematischen Gewebe zur Aufrechterhaltung des vollen Proplastidensatzes in der Zeiteinheit größer sein als die der sich differenzierenden Plastiden.

2. Von einer durchschnittlichen Proplastidenzahl von 20 in der meristematischen Zelle wächst die Plastidenzahl im Laufe der Entwicklung des Plastidoms zu einer Zahl von 100 bis 120 Chloroplasten pro Zelle. Insbesondere vollziehen die noch amöboiden multigranulären Plastiden intensive Teilungen.

3. Die Plastidenmetamorphose vollzieht sich unabhängig von der Zelldifferenzierung; sie scheint weitgehend lichtabhängig zu sein.

4. Im Laufe der Entwicklung des Plastidoms entsteht die Mehrzahl der Chloroplasten pro Mesophyllzelle durch die hohe Teilungsrate der amöboiden, multigranulären Plastiden. Die in ihrer Differenzierung bereits fortgeschrittenen, nicht amöboiden Jungchloroplasten führen nur wenige ergänzende Teilungen durch. Die somatischen Chloroplasten sind nicht mehr teilungsfähig, sie setzen aber ihr Größenwachstum fort.

5. Die jungen multigranulären Stadien der Plastidenentwicklung teilen sich durch einfache Durchschnürung (Fragmentation) ihrer Substanz. Bei

den differenzierteren, fester strukturierten Plastidenformen (Jungchloroplasten) kommt es bei der Teilung zur Bildung farbloser Zwischenzonen.

6. Bei der Beobachtung etiolierten Ausgangsmaterials konnte im Verlaufe mehrerer Belichtungstage festgestellt werden, daß die Teilungsgeschwindigkeit im multigranulären, noch amöboiden Stadium größer ist als die Teilungsgeschwindigkeit älterer Stadien.

7. Die Größe der aus dem etiolierten primären Granum entstandenen Sekundärgrana zeigt eine reziproke Abhängigkeit von der bei der Ergrünung wirksamen Lichtintensität.

8. Bei einer relativ niedrigen Bestrahlungsstärke — in den vorgenommenen Versuchen bei 500 und 2000 Lux — fand eine normale Strukturausbildung der Plastiden statt. Von 10.000 Lux an aufwärts stellten sich proportional der Dauer und der Intensitätssteigerung Plastidenschädigungen ein. In der folgenden, unter normaler Belichtung ablaufenden Entwicklung intensiv bestrahlter, etiolierter Plastiden zeigten sich besonders deutlich sehr stark vergrößerte Chloroplasten neben kleinen farblosen Plastiden, deren Entwicklung durch die hohe Lichtstärke im jugendlichen Stadium unterbunden worden war.

9. Die Entwicklung etiolierter Plastiden unter Blaulicht geht schneller vor sich als unter Rotlicht. Daraus wird geschlossen, daß das Absorptionsmaximum der für die Entwicklung der Plastiden verantwortlichen Substanzen im kurzwelligen Bereich liegt.

Literatur

Böing, J., 1953: Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Chloroplasten. Diss. Münster.

Cohen, M., and E. Bowler, 1953: Lamellar Structure of the Tobacco Chloroplast. Protoplasma *42*, 414.

Dangeard, P., 1947: Cytologie végétale et cytologie générale. Encycl. biol. *26*, Paris.

Egle, K., 1944: Untersuchungen über die Resistenz der Plastidenfarbstoffe. Bot. Arch. *45*, 93.

Emberger, L., 1927: Nouvelles recherches sur le chondriome de la cellule végétale. Rev. gen. de Bot. *39*, 341.

Grave, G., 1954: Studien über die Entwicklung der Chloroplasten bei *Agapanthus umbellatus*. Protoplasma *44*, 273.

Heitz, E., 1922: Untersuchungen über die Teilung der Chloroplasten. Diss. Heidelberg.

— 1925: Einige Bemerkungen über Chloroplastenteilung und Chloroplastengröße. Biol. Zbl. *45*, 179.

— 1936: Untersuchungen über den Bau der Plastiden. Planta *26*, 134.

Kiyohara, K., 1932—1936: Zur Schimper-Meyerschen Theorie der Vermehrung der Chloroplasten. J. Fac. Science Tokyo *4*, 399.

Knudsen, L., 1940: Permanent changes of chloroplasts by X-rays in the gametophyte of *Polypodium aureum*. Bot. Gaz. *101*, 721.

Kny, L., 1872: Aus den Sitzungsberichten der Gesellsch. naturforschd. Freunde zu Berlin. Bot. Ztg. *30*. 14.

Küster, E., 1904: Beiträge zur Physiologie und Pathologie der Pflanzenzelle. Z. allg. Physiol. *4*, 221.
— 1911: Die Gallen der Pflanzen. Leipzig.
— 1925: Pathologische Pflanzenanatomie. Jena.
— 1951: Die Pflanzenzelle. Jena.
Kusunoki, S., und Y. Kawasaki, 1936: Beobachtungen über die Chloroplastenteilung bei einigen Blütenpflanzen. Cytologia *7*, 330.
Lärz, H., 1942: Beiträge zur Pathologie der Chloroplasten. Flora *135*, 319.
Laughlin, H. H., 1919: Duration of the several mitotic stages in the dividing root tip cells of the common onion. Publicat. Carnegie Inst. Washington *265*.
Lopriore, G., 1904: Über Chlorophyllbildung bei partiärem Lichtabschluß. Ber. dtsch. bot. Ges. *21*, 385.
Maige, A., 1928: Conditions physico-chimique des plastes. C. r. Acad. Sc. Paris *196*, 424.
Marshak, A., 1937: The effect of X-rays on chromosomes in mitosis. Proc. Nation. Acad. Sci. *23*, 362.
Meyer, A., 1883: Das Chlorophyllkorn. Leipzig.
Mikosch, C., 1877: Über Vermehrung der Chloroplasten durch Teilung. Öst. bot. Z. *27*, 42.
Montfort, C., und G. Zöllner, 1942: Beständigkeit und Zerstörung des Chlorophylls im Blatt. Bot. Arch. *43*, 393.
— 1953: Photochemische Wirkungen der langwelligen Hälfte des Sonnenspektrums auf Chlorophyllspiegel und Lebenszustand photolabiler Assimilationsgewebe. Ber. dtsch. bot. Ges. *46*, 183.
Nägeli, C. v., 1864: Bläschenförmige Gebilde im Inhalte der Pflanzenzellen. Z. wiss. Bot. *3/4*, 119.
Pyrkosch, G., 1936: Der Einfluß des Lichtes auf kolloide Systeme. Protoplasma *26*, 320.
Reinhard, H., 1933: Über die Teilung der Chloroplasten. Protoplasma *19*, 541.
Reinke, 1893, zit. nach Strott, 1938. Jb. wiss. Bot. *86*, 1.
Reiter, T., und D. Gabor, 1928: Zellteilung und Strahlung. Wiss. Veröffentl. Siemens-Konzern, Berlin.
Rudolph, H., 1934: Über die Einwirkung des farbigen Lichtes auf die Entstehung der Chloroplastenfarbstoffe. Planta *21*, 104.
Sachs, J. v., 1862: Übersicht der Ergebnisse der neueren Untersuchungen über das Chlorophyll. Flora *45*, 129.
Sanio, C., 1864: Über endogene Gefäßbündelbildung. Bot. Ztg. *22*, 193.
Sapěhin, A. A., 1911: Über das Verhalten der Plastiden im sporogenen Gewebe. Ber. dtsch. bot. Ges. *29*, 491.
Schanz, F., 1919: Wirkungen des Lichtes verschiedener Wellenlänge auf die Pflanzen. Ber. dtsch. bot. Ges. *37*, 430.
Scherrer, A., 1915: Untersuchungen über Bau und Vermehrung der Chromatophoren und das Vorkommen von Chondriosomen bei Anthoceros. Flora *107*, 1.
Schimper, A. F., 1885: Untersuchungen über Chlorophyllkörner und die ihnen homologen Gebilde. Jb. wiss. Bot. *16*, 1.
Schleep, W., 1954: Beiträge zur Physiologie der Pigmentbildung in belichteten etiolierten Blättern. Diss. Münster, im Erscheinen.
Schumacher, W., 1928: Ein Beitrag zur Kenntnis des Stoffwechsels panaschierter Pflanzen. Planta *5*, 161.
Schürhoff, P. N., 1924: Die Plastiden. Linsbauers Handbuch d. Pflanzenanatomie. Berlin.

Schwarz, W., 1928: Zur Ätiologie der geaderten Panaschierung. Planta *5*, 660.
Senn, G., 1917: Weitere Untersuchungen über Gestalts- und Lageveränderungen der Chromatophoren. Verh. Naturf. Ges. Basel *28*, 104.
Steinmann, E., J. B. Finean und F. S. Sjöstrand, 1953: Exper. Cell. Res. *4*, Nr. 4 (1953).
Strugger, S., 1937: Die Vitalfärbung der Chloroplasten von *Helodea* mit Rhodaminen. Flora *131*, 113.
— 1950: Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. Naturw. *37*, 166.
— 1951: Die Strukturordnung im Chloroplasten. Ber. dtsch. bot. Ges. *64*, 69.
— 1953: Über die Struktur der Proplastiden. Ber. dtsch. bot. Ges. *46*, 439.
— 1954: Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* L'Hérit. Protoplasma *43*, 120.
— 1955: Über die Struktur der Proplastiden. Ber. dtsch. bot. Ges. *66*, 439.
Timoféeff-Ressovsky, N. W., und K. Zimmer, 1947: Biophysik Bd. 1. Das Trefferprinzip in der Biologie. Leipzig.
Tischler, G., 1951: Allgemeine Pflanzenkaryologie. Handb. d. Pflanzenanatomie v. Linsbauer. Bd. 2, 2. Hälfte, 2. Aufl. Berlin.
Weier, T. E., 1951: A study of the moss plastid after fixation by mitochondrial osmium and silver technique L. Cellule *40*, 261.
Zimmermann, A., 1893: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle. Tübingen.

Über die Strukturanalyse der Eiweißspindeln der *Cactaceae*

(Vorläufige Mitteilung)

Von

F. Amelunxen[1]

Mit 10 Textabbildungen

Aus dem Botanischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

(Eingelangt am 19. April 1955)

Fibrilläre und homogene Eiweißspindeln sind seit ihrer Entdeckung durch Molisch (1885) bei verschiedenen Genera und Spezies der *Cactaceae* im Cytoplasma und seltener auch im Kern (Zellkernkristalloide von Miličić 1953) gefunden worden. Die typische Spindelgestalt mit längsfibrillärem Aufbau ist die vorherrschende Form unter den Eiweißspindeln, doch werden auch andere Bildungen mit gleichem Aufbauprinzip beobachtet.

Rosenzopf (1950) vertritt die Ansicht, daß die Eiweißspindeln Virus-Einschlußkörper sind. Sie konnte zeigen, daß das Agens, welches die Spindelbildung hervorruft, von spindelhaltigen Pflanzen auf spindelfreie übertragen werden kann. Bei Pfropfungen geht das Agens vom spindelhaltigen zum spindelfreien Pfropfpartner über. Nach Injektionen von Gewebesaft spindelhaltiger Pflanzen in spindelfreie Exemplare lassen sich in 5 bis 6 Wochen nach der Injektion in der Umgebung der Impfstelle die ersten Eiweißspindeln nachweisen. Der Saft spindelhaltiger Pflanzen behält seine Infektionsfähigkeit auch dann, wenn er ein Berkefeldfilter passiert hat. — Für eine Virusnatur der Eiweißspindeln spricht auch das Vorkommen von cytoplasmatischen Einschlußkörpern, wie sie aus viruskranken Pflanzen in Form der X-bodies bekannt sind. In diesen Einschlußkörpern wurde die Bildung der Eiweißspindeln beobachtet (Weber, Kenda und Thaler 1952).

Die Fibrillen der Spindeln liegen in einer vom Cytoplasma abgesonderten interfibrillären Substanz (Zwischensubstanz — Molisch 1885), welche

[1] Herrn Prof. Dr. S. Strugger danke ich herzlich für die Überlassung und Förderung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. G. Pfefferkorn bin ich für die großzügige Unterstützung bei den elektronenoptischen Untersuchungen zu Dank verpflichtet.

bei locker gebauten Spindeln und bei solchen mit derben Fibrillen selbst Spindelform annehmen kann (Weber und Kenda 1932). Küster (1934) nimmt nach polarisationsoptischen Untersuchungen einen micellaren Aufbau der Eiweißspindeln an. Die zur Spindellängsachse positive Doppelbrechung wird durch Chemikalien — wie z. B. Chloralhydrat oder 10%ige Schwefelsäure — in eine negative Anisotropie umgewandelt. Dieser Wechsel der Doppelbrechung wird durch eine Umlagerung der parallel zur Längsachse gerichteten Micellen um 90° gedeutet. Die Änderung des polarisationsoptischen Verhaltens kann aber auch durch eine zickzackartige Fältelung von Fadenmolekeln entstehen (Astbury, s. Küster, „Die Pflanzenzelle", 1935).

Zur weiteren Analyse der mikroskopischen und submikroskopischen Struktur der Eiweißspindeln wurden Quellungsversuche am lebenden und fixierten Material und elektronenoptische Untersuchungen durchgeführt.

Bei der Einwirkung einer 1 mol. KSCN-Lösung auf Eiweißspindeln in lebenden Epidermiszellen von *Opuntia monacantha* quellen die Spindeln im einfachsten Fall überall gleichmäßig auf. Die Anzahl der lichtmikroskopisch wahrnehmbaren Fibrillen nimmt dabei ständig zu, was durch eine Auflockerung dicker und dicht gelagerter Fibrillenbündel in mehrere dünne, noch lichtmikroskopisch nachweisbare Bündel hervorgerufen wird (Abb. 1 *a*, *b*). Diese Entbündelung erleichtert nun offensichtlich die Deformierbarkeit der Gesamtspindel, so daß durch die isotrop quellende interfibrilläre Substanz eine Abkugelung der Spindel eintreten kann (Abb. 1 *b*). Deutlich wird dieses Verhalten — und vor allem die Existenz einer interfibrillären Substanz —, wenn sich Fibrillenbündel und interfibrilläre Substanz während des Quellungsprozesses voneinander trennen: aus der interfibrillären Substanz bildet sich eine vom Plasma durch eine sehr feine Membran abgegrenzte Solblase, in der sich die aufgelockerten Fibrillenbündel befinden (Abb. 1 *c*, *d*; vgl. Abb. 1 *g*). Diese gehen, nachdem sich die interfibrilläre Substanz mit dem Plasma vermischt hat, in feine Granulaschnüre über (Abb. 1 *e*; vgl. Abb. 3 *a*). Der lichtmikroskopisch nicht mehr nachweisbare Zusammenhalt der einzelnen Granula wird dadurch bewiesen, daß die zarte Membran, welche die Eiweißspindeln umgibt, in einigen Fällen schon zu Beginn der Quellungsversuche in Kaliumrhodanidlösungen zerstört wird; hiebei kann ein Fibrillenbündel aus dem Spindelverband herausragen und im Plasma schnell in eine Granulaschnur übergehen (Abb. 1 *e*). Sie befindet sich — im Gegensatz zu den Fibrillen im Spindelverband — in schlängelnder Bewegung (B. M. B.)[2], bei der die einzelnen Granula eine konstante Lage zueinander beibehalten. — Bei Verwendung von 1 mol. KNO_3-Lösung erhält man im wesentlichen dieselben Ergebnisse. Durch Quellung bewirkte Veränderungen an den Eiweißspindeln stellen sich aber erst nach längerer Plasmolyse (12 bis 36 Stunden) ein, da es erst dann zu einer gesteigerten Salzintrabilität kommt (s. Strugger: „Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze", 2. Auflage, 1949; dort weitere Lit.). Dafür wirkt Kaliumnitrat aber schonender als Kaliumrhoda-

[2] Brownsche Molekularbewegung.

nid, was sich in einer weitgehenderen Auflockerung in noch feinere Fibrillenbündel auswirkt (Abb. 1 *f*).

In Anlehnung an die Gedankengänge Struggers, an fixierten Chloroplasten durch nachträgliche Quellung den lichtmikroskopischen Feinbau näher zu ergründen, wurden auch bei den Eiweißspindeln Quellungs-

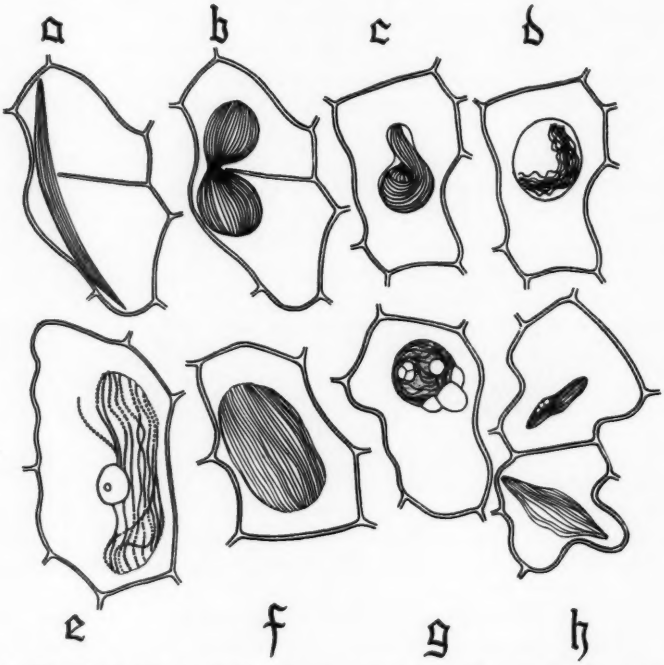


Abb. 1. Eiweißspindeln in Epidermiszellen von *Opuntia monacantha*. *a*—*e* nach Kaliumrhodanidquellung; *a* unbeeinflußte Eiweißspindel, *b* gleichmäßige Quellung, *c*, *d* Trennung der Fibrillen von der interfibrillären Substanz, *e* Umwandlung der Fibrillen in Granulaschnüre und Nachweis des Zusammenhalts der Granula; *f* und *g* nach Kaliumnitratquellung, *f* gleichmäßige Quellung, *g* die interfibrilläre Substanz quillt in blasiger Form durch die Fibrillen hindurch; *h* Fixation mit *n*/10 Jodlösung, Spindel der oberen Zelle gelbbraun gefärbt, die der unteren Zelle farblos und gequollen. Zu *a* vgl. „Zellteilungsanomalien" von Milićić 1954.

versuche nach einer Fixation durchgeführt. Die Prüfung der gebräuchlichen Fixationsmittel ergab, daß neben gut fixierten auch viele stark veränderte, meist „vakuolige" Spindeln erhalten werden. Nur bei Anwendung einer Osmiumsäure-Räucherung (2%ige Lösung — 1 Stunde) werden die Eiweißspindeln fast durchweg gut fixiert. Darüber hinaus hat diese Methodik noch einen strukturanalytischen Wert; die Entflechtung in sehr feine Fibrillenbündel ist noch weitgehender, als es oben beschrieben wurde. Ebensogut in bezug auf eine Feinbauanalyse erwies sich die Fixation mit einer *n*/10

Jodlösung (nach Merck), die gemäß ihrer Zusammensetzung ($KJ.J_2$) fixierend, färbend und zugleich auch quellend wirkt.

Verfährt man nach der letztgenannten Methode so, daß sich das Jod (J_2) allmählich verflüchtigen kann (24stündiges Aufbewahren eines Schnittpräparates in einer feuchten Kammer), so resultieren einerseits Spindeln, die in Größe und Form gut erhalten und gelbbraun gefärbt sind — andererseits solche, die schon wieder farblos geworden sind (Abb. 1 *h*). Bei diesen kann sich die interfibrilläre Substanz noch innerhalb der Eiweißspindel befinden oder schon mit dem Cytoplasma vermischt haben. Färbt man mit einer 0,2%igen Säurefuchsinlösung (3 bis 4 Stunden) an, so sind die Eiweißspindeln mit interfibrillärer Substanz intensiv rot gefärbt, während bei Eiweißspindeln, deren interfibrilläre Substanz sich mit dem Plasma vermischt hat, lediglich eine Fibrillenfärbung zu beobachten ist. Es ist also

Abb. 2. Eiweißspindeln in Epidermiszellen von *Opuntia monacantha*. Fixation mit *n*/10 Jodlösung und Färbung mit Säurefuchsin. Die Spindeln in der linken und rechten Zelle enthalten noch die gefärbte interfibrilläre Substanz, in der mittleren Zelle ist nur eine Fibrillenfärbung zu sehen.

auf diese Weise möglich, die interfibrilläre Substanz der Eiweißspindeln neben den Fibrillen färberisch nachzuweisen (Abb. 2). Diese beiden Bestandteile der Eiweißspindeln lassen sich aber auch gut unterscheiden, wenn man mit Jodjodkalium vorgequollene und fixierte Spindeln einer weiteren Quellung mit 0,5%iger NaOH unterwirft. In farblose Eiweißspindeln ohne interfibrilläre Substanz kann die Natronlauge offenbar sehr schnell eindringen. Neben einer nur noch schwachen Breitenzunahme der Spindeln erfolgt eine schnelle Umwandlung der homogenen Fibrillen in feine Granulaschnüre, die alle infolge der B. M. B. wellenartig bewegt werden (Abb. 3 *a*). Die Granula sind etwa 0,3 μ groß und ihre Verbindungsstücke auch hier mikroskopisch unsichtbar. — Befindet sich dagegen die interfibrilläre Substanz noch innerhalb der Eiweißspindel, so quillt sie bei der NaOH-Behandlung schnell über den Fibrillenbereich hinaus, bis eine Grenzschicht zwischen dem Cytoplasma und der interfibrillären Substanz deutlich abgehoben ist (Abb. 3 *c*). Nach einigen Minuten nimmt jedoch das Volumen der gequollenen interfibrillären Substanz wieder ab, d. h. es tritt wahrscheinlich eine Vermischung mit dem Cytoplasma ein. Auch hier kommt es danach

zu einer Umwandlung der Fibrillen in Granulaschnüre, die nicht mehr von einer feinen Membran umgeben sind (Abb. 3 *d*). — Die Untersuchungen ließen sich derart verfeinern, daß Quellungsversuche mit 1%iger KOH an Eiweißspindeln vorgenommen wurden, die vorher durch Osmiumsäure-Räucherung weitgehend in feinste Fibrillenbündel aufgeteilt waren (s. o.). Diese Fibrillenbündel gehen nach der Quellung der interfibrillären Substanz teils in sehr zarte Granulaschnüre über, teils zerfallen sie in einzelne Granula.

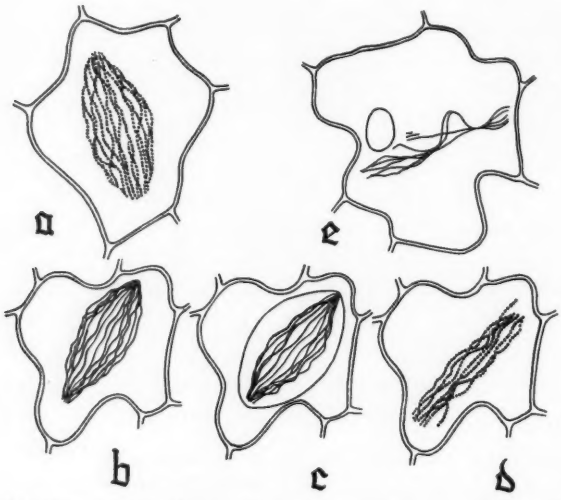


Abb. 3. Spindelführende Epidermiszellen von *Opuntia monacantha*. Fixation mit *n*/10 Jodlösung und Quellung mit 0,3%iger NaOH. *a* Quellung einer Spindel ohne interfibrilläre Substanz, Umwandlung der Fibrillen in Granulaschnüre; *b—d* Quellung einer Spindel mit interfibrillärer Substanz, *b* vor der Quellung, *c* Quellungsmaximum der interfibrillären Substanz, *d* interfibrilläre Substanz wahrscheinlich mit dem Plasma vermischt, Fibrillen in Granulaschnüre umgewandelt; *e* irreguläre NaOH-Quellung, nach Säurefuchsinfärbung sind nur noch einige Fibrillen zu beobachten.

Nun ist das für die Quellungsversuche dargelegte Verhalten aber nicht regelmäßig zu beobachten. So gibt es Quellungsbilder, bei denen die Eiweißspindeln — unabhängig vom Quellungsmittel — schon zu Beginn der Versuche homogen werden und kurz darauf mikroskopisch nicht mehr sichtbar sind. Es gelingt in einigen Fällen, Stadien dieses Überganges durch Färbung noch zu erfassen. Eine NaOH-Quellung z. B. verlief zunächst wie oben beschrieben, bis plötzlich keine Fibrillen mehr nachzuweisen waren. Eine anschließend durchgeführte Säurefuchsinfärbung (0,2%ige Lösung — unter Beobachtung) ließ noch einige dünne Fibrillen erkennen (Abb. 3 *e*). Die meisten Fibrillen sind also entweder aufgelöst worden, oder die lichtmikroskopischen Fibrillen sind in submikroskopische feinste Fäden zer-

fallen. — In diesem Zusammenhange sei erwähnt, daß die fibrilläre Ordnung in den Eiweißspindeln schon allein durch einen mechanischen Eingriff völlig zerstört werden kann. Sticht man eine Eiweißspindel in einer großen Kollenchymzelle von *Opuntia monacantha* mit einer spitz ausgezogenen Glasnadel an, so wird sie in eine homogene Solblase umgewandelt. Die Nadeln des Kartoffel-X-Virus zeigen ein ähnliches Verhalten. — K ö h l e r 1942.

Zur Klärung der genannten Unregelmäßigkeiten wurden elektronenmikroskopische Studien durchgeführt, um festzustellen, welche Strukturen noch unterhalb der lichtmikroskopischen Sichtbarkeitsgrenze in den Spindeln existieren.

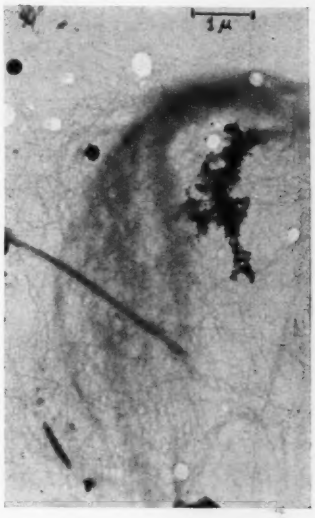


Abb. 4. Aus einer Zelle von *Opuntia monacantha* isolierte Eiweißspindel im Elektronenmikroskop. 9500×.

Um die elektronenmikroskopischen Bilder mit Eiweißspindeln zu identifizieren, war es zunächst erforderlich, eine möglichst gut erhaltene Eiweißspindel im Elektronenmikroskop abzubilden. Es mußte zugleich aber auch eine Auflockerung in feinere Fibrillen erfolgen, um scharfe Strukturen erkennen zu können. Als günstigste Methode erwies sich deshalb (vgl. oben) eine OsO_4-Räucherung kleiner Flächenschnitte, die nach der Fixation in aq. bidest. zerkleinert wurden. Nach Entfernung der Schnittreste wurde die Flüssigkeit auf Trägerfolien übertragen. — Die Abb. 4 zeigt eine Gesamtspindel, Abb. 5 einen stark vergrößerten Teil einer Eiweißspindel. Die feinsten Fibrillen haben eine Breite von 22 mμ. In der elektronenoptischen Abbildung ist eine Struktur innerhalb der Fibrillen nicht wahrnehmbar. Schwärzungsdifferenzen kommen durch Überkreuzungen der Fibrillen zustande. Vielfache der Breite von 22 mμ sind an mehreren Stellen zu messen; es handelt sich dabei um lateral aggregierte Fibrillen. Einige in Spindellängsrichtung verlaufende Fibrillenaggregate sind in Bildmitte der Abb. 5 zu erkennen. Deutlicher wird die Parallellagerung der submikroskopischen Fibrillen zu Fibrillenbündeln aus der Abb. 6. Von den drei Fibrillenbündeln haben zwei eine streckenweise Auflockerung in dünnere Fibrillenaggregate und Einzelfibrillen erfahren, während das dritte, schräg durch die Abbildung verlaufende Bündel kompakt geblieben ist und überall eine Breite von etwa 200 mμ aufweist. Es kann angenommen werden, daß diese Fibrillenbündel die lichtmikroskopischen Fibrillen darstellen. — Die Länge der einzelnen submikroskopischen Fibrillen ist recht beträchtlich, wie man bei weitgehend aufgelockerten Fibrillenverbänden erkennen kann (Abb. 7). An

einigen Stellen der Abb. 7 sind noch gabelförmige Aufspaltungen von Lateralaggregaten zu sehen.

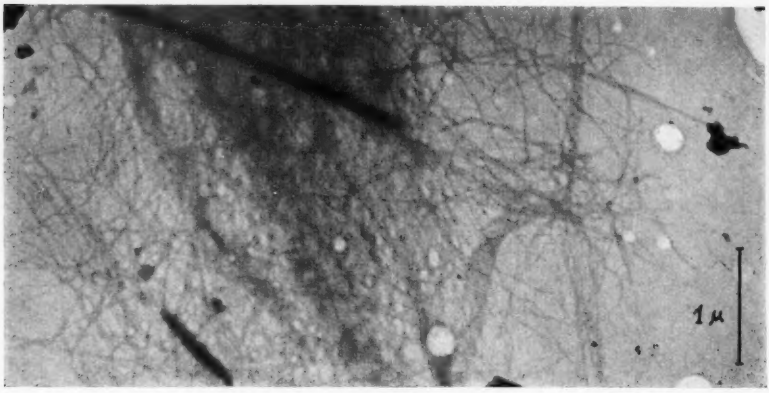


Abb. 5. Teil einer Eiweißspindel. Parallelaggregate der 22 mμ dicken submikroskopischen Fibrillen sind an mehreren Stellen zu sehen; in Bildmitte sind sie in Längsrichtung der Spindel orientiert. El.-opt. 18.300 ×.

Eine Längenbestimmung kürzerer Einzelfäden, welche durch eine lineare Aggregation die langen submikroskopischen Fibrillen aufbauen, kann nicht

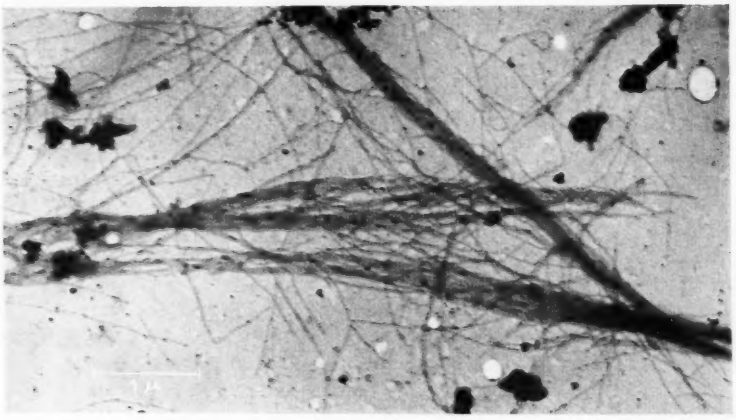


Abb. 6. Fibrillenbündel einer Eiweißspindel. Das schräg durch die Abbildung verlaufende Bündel ist in der Form gut erhalten, während die anderen beiden Bündel teilweise aufgelockert sind. El.-opt. 17.000 ×.

am fixierten Material vorgenommen werden, da hiebei nur vereinzelt kürzere Fäden zu beobachten sind. Die Abbildung kürzerer Einzelfäden im

Elektronenmikroskop gelingt dagegen leicht nach folgender Methode. Sechs, etwa 4 bis 9 mm² große Flächenschnitte von *Opuntia monacantha* werden in aq. dest. mit einem pH-Wert von 3,8 zerkleinert. Das Homogenisat wird in kleine, dünne Reagensgläschen aufgenommen und mit aq. dest. auf 1 cm³ Flüssigkeit verdünnt. Durch eine Zentrifugierung werden anschließend alle Zelltrümmer niedergeschlagen. Es erwies sich nach einigen Vorversuchen am günstigsten, das Homogenisat bei 12.000 Umdrehungen in der Minute (entsprechend 11.000 g) 30 Minuten lang bei einem Temperaturintervall von +4 bis −4° zu zentrifugieren. Die überstehende klare Flüssigkeit, die

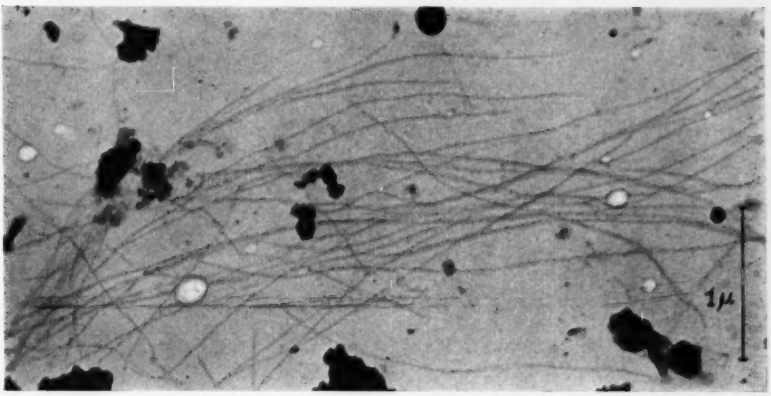


Abb. 7. Weitgehende Aufspaltung der Fibrillenbündel einer Eiweißspindel in submikroskopische Einzelfibrillen. An einigen Stellen sind noch gabelförmige Aufspaltungen zu erkennen. El.-opt. 23.300 ×.

nunmehr einen pH-Wert von 7,65 aufweist, wird abgehebert und nach Verdünnung mit dem gleichen Volumen aq. dest. sofort auf Trägerfolien übertragen. Im Elektronenmikroskop läßt sich bei dieser Konzentration neben einer amorphen, wahrscheinlich aus Zelleiweiß bestehenden Substanz lediglich ein fibrilläres Netzwerk erkennen (Abb. 8). Verdünnt man aber die Ausgangskonzentration (sechs homogenisierte Flächenschnitte pro Kubikzentimeter aq. dest.) auf das Sechs- bis Achtfache, so kann man auf den Folien kürzere und längere Einzelfäden beobachten (Abb. 9). Bei einer Längenmessung von 272 Einzelfäden entfallen 33,4% auf eine Länge von 600 mμ und 12,2% auf eine Länge von 1200 mμ (s. graphische Darstellung Abb. 10). Alle weiteren Messungen übersteigen nur selten 2%. Aus der Lage der beiden Häufigkeitsmaxima kann 600 mμ als Längeneinheit eines Fadens angenommen werden. Die Länge von 1200 mμ kommt sehr wahrscheinlich durch eine lineare Aggregation von zwei Fadeneinheiten zustande.

Die Dicke der Fäden wurde einmal auf photometrischem Wege und zum anderen durch direktes Ausmessen der Fäden auf den photographischen Platten mit Hilfe eines Okularmikrometers bei Lupenvergrößerung bestimmt. Bei Präparaten, die unter einer Lampe eingetrocknet wurden, er-

gibt sich photometrisch eine Teilchendicke von 22 bis 26 mμ und durch Messung eine Dicke von 22 mμ. Wurden die Lösungen auf den Folien dagegen über Phosphorpentoxyd getrocknet, so wird bei beiden Meßmethoden ein Wert von 18 mμ erhalten. Der Durchmesser der Teilchen beträgt somit 22 ± 4 mμ. — Eine genauere Angabe der Teilchendicke ist erst nach weiteren physikalischen Größenbestimmungen möglich.

Ein wichtiger Beweis dafür, daß es sich bei den abgebildeten Fäden um Spindelbestandteile handelt, kann durch eine vergleichende elektronen-

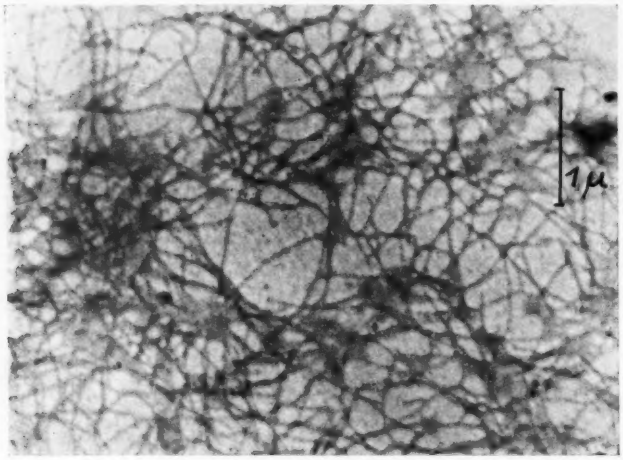


Abb. 8. Fibrilläres Netzwerk — entstanden durch eine lineare Aggregation kurzer Einzelfäden. Näheres im Text. El.-opt. 18.000 ×.

mikroskopische Prüfung von Homogenisaten eines spindelführenden und spindelfreien Exemplars derselben Art erbracht werden. Im Botanischen Garten unseres Instituts sind zwei Exemplare von *Opuntia hersfeldii* vorhanden, ein spindelfreies und ein spindelhaltiges. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der nach obiger Methode zentrifugierten Homogenisate beider Exemplare lassen sich nur bei der spindelhaltigen Art Einzelfäden wie in der Abb. 9 nachweisen, während das Homogenisat des spindelfreien Exemplars nur eine amorphe Substanz auf den Folien erkennen läßt. Um Irrtümer weitgehend auszuschließen, wurde die Ausgangskonzentration der Homogenisate (wie oben) bei dem Exemplar mit Eiweißspindel 3½fach, die des spindelfreien Exemplars dagegen nur ½fach verdünnt. Bei dieser Konzentration könnte — wie entsprechende Versuche bei *Opuntia monacantha* lehren — bei Vorhandensein von Fäden nur die Form eines fibrillären Netzes entstehen (vgl. Abb. 8).

Bei einem Vergleich der Abb. 4 bis 9 mit den ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Viren (K a u s c h e, P f a n k u c h und R u s k a 1939) ergibt sich eine Parallelität in der submikroskopischen Struktur der

Einzelfäden, Fibrillen und Fibrillenaggregate der Eiweißspindeln zu den Einzelfäden und Fadenaggregaten des Tabakmosaik- und Kartoffel-X-Virus. (Man vergleiche die Abbildungen der genannten Autoren in „Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop", Naturwiss., 27. Jahrg.,

Abb. 9. 600 mμ lange und 22 mμ dicke Einzelfäden und Linearaggregate von Einzelfäden. El.-opt. 26.500 ×.

Heft 18, 1939.) Unter Zugrundelegung dieses Vergleichs darf angenommen werden, daß in den 600 mμ langen und 22 ± 4 mμ dicken Fäden Makromoleküle vorliegen.

Aus untersuchungstechnischen Gründen ist beim elektronenmikroskopischen Arbeiten ein Übergang vom Feucht- zum Trockengel notwendig. Hiebei können die Fadenmolekeln nach den Regeln der Strukturlehre bei ge-

eigneter Konzentration nur die Form eines linear und lateral aggregierten Gerüstwerkes annehmen. Deshalb kann nicht exakt entschieden werden, ob die submikroskopischen Einzelfäden in den lichtmikroskopischen Fibrillen der Eiweißspindeln in der lebenden Zelle (Feuchtgel) noch mehr oder weniger individualisiert vorliegen. Nach Herrmann, Gerngroß und Frey-Wyssling (s. Kausche, Pfankuch und Ruska 1939) ist aber die Wahrscheinlichkeit der Entstehung kristalliner Bereiche um so größer, je länger die Molekülketten parallel miteinander verlaufen, so daß man in den Fibrillenbündeln neben Lateral- wohl auch Linearaggregation der Einzelfäden annehmen darf.

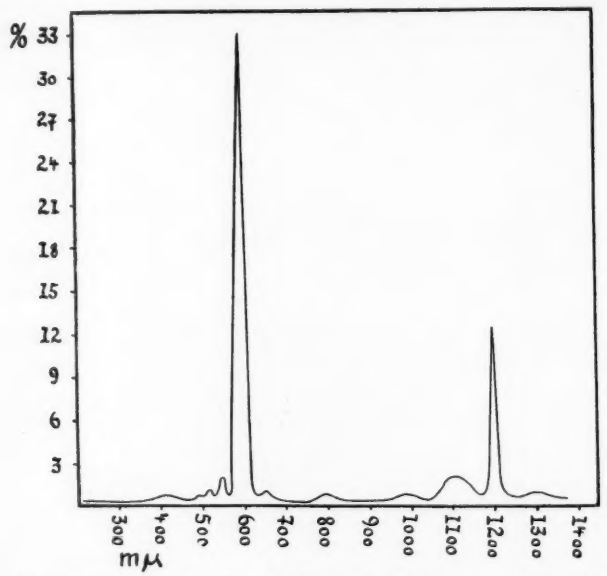


Abb. 10. Längenmessungen der Einzelfäden, Häufigkeitskurve. Abszisse: Länge der Fäden in Millimikron; Ordinate: Häufigkeit der angegebenen Fadenlänge in Prozent. (272 Längenmessungen = 100%.)

Nach Kenntnis der submikroskopischen Struktur der Eiweißspindeln wird auch ihr regelloses Verhalten bei derselben chemischen Behandlungsweise sowie beim Anstichsversuch mit einer Glasnadel verständlich. Die Parallellagerung der submikroskopischen Fibrillen zu lichtmikroskopischen Bündeln ist sicherlich unterschiedlich fest, so daß die Spindeln einmal einer lichtmikroskopisch zu verfolgenden Quellung zugänglich sind, zum anderen aber auch sofort in submikroskopische Fibrillen auseinanderfallen können und damit im Lichtmikroskop homogen und schließlich unsichtbar werden. — Der Zerfall der Fibrillen in Granula bzw. Granulaschnüre muß im Elektronenmikroskop noch näher untersucht werden. Der Zusammenhalt der Granula mag dadurch bedingt sein, daß die Einzelfäden innerhalb eines

Fibrillenbündels nicht immer in gleicher Höhe nebeneinander liegen werden, sondern auch gegenseitig versetzt sein können; hiedurch entsteht dann eine haftende Wirkung.

Die eingangs erwähnten polarisationsoptischen Untersuchungen Küsters werden durch die submikroskopische Strukturanalyse der Eiweißspindeln bestätigt. Bei wenig veränderten Spindeln beruht der Wechsel von der positiven zur negativen Anisotropie auf einer Fältelung der Fadenmolekeln in den lichtmikroskopischen Fibrillen. Bei starken Veränderungen der Eiweißspindeln bis zu gleichmäßig gerundeten, homogenen Kugeln nehmen die Fadenmolekeln dagegen eine ungeordnete Lage zueinander ein; diese Gebilde sind optisch isotrop. Zwischen beiden Extremen gibt es Übergänge.

Zusammenfassung

1. Die Eiweißspindeln bestehen aus einer isotrop quellbaren interfibrillären Substanz, die sich während der Quellung von den Fibrillen trennen kann. Die Fibrillen gehen bei den Quellungsversuchen — nach Zerlegung in feinere, noch lichtmikroskopisch sichtbare Fibrillen — in Granulaschnüre über. Die Granula sind etwa 0,3 μ groß und durch submikroskopische Zwischenstücke verbunden, was indirekt nachgewiesen wurde.

2. Nach Fixation mit einer *n*/10 Jodjodkaliumlösung gelingt es, die interfibrilläre Substanz von den Fibrillen durch Färbung zu unterscheiden.

3. Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen bilden zahlreiche, 22 mμ dicke submikroskopische Fibrillen durch Parallelaggregation lichtmikroskopische Fibrillenbündel. Viele dieser Fibrillenbündel setzen in Parallellagerung eine Eiweißspindel zusammen. (Untersucht am fixierten Material.)

4. Die submikroskopischen Fibrillen der Eiweißspindeln entstehen durch eine lineare Aggregation kurzer Einzelfäden, die sehr wahrscheinlich eine Länge von 600 mμ und eine Dicke von 22 ± 4 mμ besitzen. (Untersucht am nicht fixierten Material.)

5. Einzelfäden und Linearaggregate von Einzelfäden ließen sich nur bei solchen Arten elektronenmikroskopisch nachweisen, bei denen auch im Lichtmikroskop Eiweißspindeln zu beobachten sind.

6. Die elektronenmikroskopischen Abbildungen der Eiweißspindeln, Spindelteile und Einzelfäden haben sehr große Ähnlichkeit mit den bekannten Aufnahmen entsprechender Strukturen vom Tabakmosaik- und Kartoffel-X-Virus.

Literatur

Amadei, G., 1898: Über spindelförmige Eiweißkörper in der Familie der Balsamineen. Bot. Zbl. *73*, 1.

Chmielewsky, V., 1887: Eine Bemerkung über die von Molisch beschriebenen Proteinkörper in den Zweigen von *Epiphyllum*. Bot. Zbl. *31*, 117.

Frey-Wyssling, A., 1938: Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate. Berlin 1938.

Gicklhorn, J., 1913: Über das Vorkommen spindelförmiger Eiweißkörper bei *Opuntia*. Österr. Bot. Z. *63*, 8.

Kausche, G. A., E. Pfankuch und H. Ruska, 1939: Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop. Naturw. *27*, 292.
Kenda, G., I. Thaler und F. Weber, 1951: Kern-Kristalloide in Stomata-Zellen? Protoplasma *40*, 624.
Küster, E., 1948: Über die Eiweißspindeln von *Impatiens*. Bot. Zbl. *67*, 27.
— 1934: Anisotrope Fibrillenbündel in Pflanzenzellen. Ber. dtsch. bot. Ges. *52*, 564.
— 1935: Die Pflanzenzelle. Jena 1935.
Mikosch, C., 1890: Über ein neues Vorkommen geformten Eiweißes. Ber. dtsch. bot. Ges. *8*, 33.
Miličić, D., 1953: Viruskörper und Zellteilungsanomalien in *Opuntia brasiliensis*. Protoplasma *43*, 228.
Molé-Bajer, J., 1953: Experimental studies on protein spindles. Acta Soc. Bot. Poloniae *22*, 811.
Molisch, H., 1885: Über merkwürdig geformte Proteinkörper in den Zweigen von *Epiphyllum*. Ber. dtsch. bot. Ges. *3*, 195.
Rinne-Berek, 1953: Anleitung zu optischen Untersuchungen mit dem Polarisationsmikroskop. Stuttgart 1953.
Romeis, B., 1948: Mikroskopische Technik. München 1948.
Rosenzopf, E., 1950: Sind Eiweißspindeln Virus-Einschlußkörper? Phyton *3*, 95.
Ruska, H., 1939: Übermikroskopische Untersuchungstechnik. Naturw. *27*, 287.
Sorauer, P., 1954: Handbuch der Pflanzenkrankheiten, 2. Bd., 6. Aufl., Viruskrankheiten. Berlin und Hamburg 1954.
Strugger, S., 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze, 2. Aufl., 1949.
— 1951: Die Strukturordnung im Chloroplasten. Ber. dtsch. bot. Ges. *64*, 69.
Wakker, J. H., 1892: Ein neuer Inhaltskörper der Pflanzenzelle. Jb. wissensch. Bot. *23*, 1.
Weber, F., 1939: Eiweißspindeln von *Valerianella*. Protoplasma *34*, 148.
— 1951: Trypanoplasten-Viruskörper von *Rhipsalis*. Phyton *3*, 273.
— 1952: Eiweißpolyeder in *Pereskiopsis*-Viruträgern. Protoplasma *42*, 289.
— 1952: Eiweißspindeln (Viruskörper) in vergilbenden *Pereskia*-Blättern. Österr. Bot. Z. *100*, 319.
— 1953: Viruskrankes *Epiphyllum*. Österr. Bot. Z. *100*, 548.
— 1953: Kakteen-Virus-Übertragung durch Pfropfung. Protoplasma *43*, 382.
Weber, F., G. Kenda, I. Thaler, 1951: „Stachelkugeln" in *Opuntia*. Phyton *4*, 98.
— — — 1952: Viruskörper in Cacteenzellen. Protoplasma *41*, 277.
— — — 1952: Eiweißspindeln und cytoplasmatische Einschlußkörper in *Pereskiopsis*. Protoplasma *42*, 239.
— — 1952: Die Viruskörper von *Opuntia subulata*. Protoplasma *41*, 378.
— — 1951: Cacteen-Virus-Eiweißspindeln. Protoplasma *41*, 111.
— — 1952: Stomata-Anomalie von *Opuntia*-Viruträgern. Österr. Bot. Z. *100*, 153.

Zur Struktur erblich verschiedener Chloroplasten von *Oenothera*

Von

Wilfried Stubbe[1] und **Dietrich von Wettstein**[2]

Aus dem Biochemischen Institut der Universität Upsala, dem Botanischen Institut der Universität zu Köln[1] und der Forstlichen Forschungsanstalt Stockholm[2]

Mit 6 Textabbildungen

(Eingelangt am 27. Mai 1955)

Bei *Oenothera* tritt als Folge von Artbastardierung häufig Weißbuntheit auf. Nach Renner (1922, 1924 und 1936) beruht diese Weißbuntheit darauf, daß eine der beiden elterlichen Plastidensorten mit dem Bastardgenom nicht ergrünungsfähig ist. Aus der Analyse reziproker Bastarde und der Möglichkeit, die farblosen Plastiden in einer Neukombination mit einem geeigneten Genotypus wieder ergrünen zu lassen, hat Renner geschlossen, daß die *Oenothera*-Arten qualitativ verschiedene Plastiden besitzen, deren spezifische Eigenschaften vom Kern unabhängig vererbt werden. Danach bilden die Plastiden ein unabhängiges genetisches Element, das Plastidom. Die Weißbuntheit oder Scheckung bei den Bastardpflanzen — einheitlich chlorophylldefekte Keimlinge kommen auch vor — wird durch den Übertritt von Proplastiden aus dem Pollen in die Eizelle und eine Entmischung im Verlaufe der Keimentwicklung erklärt. Die Pflanzen stellen schließlich in bezug auf die Plastidenverteilung Sektorial- oder Periklinalchimären dar.

In den Kulturen findet man gelegentlich auch gescheckte Pflanzen, bei denen der Chlorophylldefekt nicht durch Bastardierung, sondern durch eine spontane Plastidommutation verursacht ist. Derartige nach „Weiß" oder „Gelbgrün" mutierte Plastiden haben nach den bisherigen Erfahrungen die Fähigkeit zu normalem Ergrünen unter jeder beliebigen Genomkombination verloren.

Soweit die Verhältnisse bei *Oenothera*. Betrachten wir die verschiedenen Chlorophylldefekte bei Pflanzen im allgemeinen — seien es gescheckte oder einfarbige Typen —, so können sie trotz morphologischer Ähnlichkeit genetisch verschiedene Ursachen haben. Der Defekt kann durch ein stabiles Gen, durch ein labiles Gen, plasmonisch und plastidomisch bedingt sein.

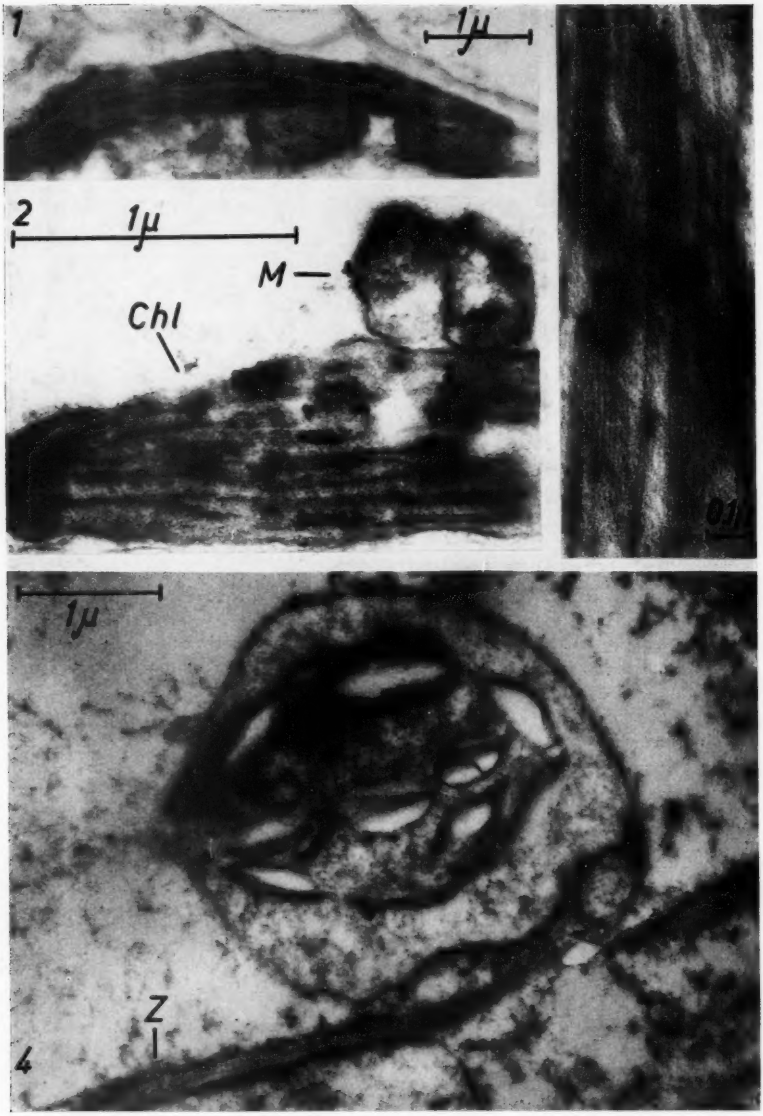


Abb. 1. Längsschnitt durch einen normalgrünen *Hookeri*-Chloroplasten mit „Grana". Elektronenoptisch, 17.000 : 1.

Abb. 2. Teil eines normalen *Hookeri*-Chloroplasten (*Chl*) und ansitzende Mitochondrien (*M*). Lamellenaufbau sichtbar, nähere Erklärung siehe Text. Elektronenoptisch, 45.000 : 1.

Eine vergleichend elektronenmikroskopische und biochemische Analyse der genbedingten Chlorophylldefekte bei der Gerste hat zumindest für die Mutanten *albina* und *xantha* gezeigt, daß die Entwicklung und Differenzierung der Chloroplasten an jeweils einer ganz bestimmten Stelle unterbrochen ist (v. Wettstein 1954b, 1955). Die Mutationen entsprechen ganz den bekannten biochemischen Mutationen bei *Neurospora*: eine Stufe in der Bildung der Lamellen, der Stroma- oder der Granastruktur ist zufolge der Genveränderung ausgefallen, und bestimmte Substanzen (= submikroskopische Strukturen) werden in großen Mengen im Chloroplasten angehäuft.

Es erschien wünschenswert, die von Plastidomdifferenzen mitbedingten Chlorophylldefekte bei *Oenothera*, für die ein reichhaltiges Material mit den verschiedenen Plastidensorten unter gleichen und verschiedenen Genomen hergestellt ist (Stubbe 1954), zu studieren und zunächst festzustellen, ob die submikroskopische Differenzierung der nicht funktionsfähigen Plastiden auf ähnliche Weise gestört ist wie bei den genbedingten Chlorophylldefekten, oder ob hier ein grundsätzlich anderer Mechanismus vorliegt. Daran schließt sich die Frage, ob man die artspezifischen Plastiden unter Genomkombinationen, mit denen sie normal ergrünungs- und funktionsfähig sind, an ihrer submikroskopischen Struktur und Differenzierung unterscheiden kann, zumal eine solche Unterscheidung lichtmikroskopisch nicht möglich ist.

Neben einer allgemeinen Orientierung beschränkt sich die vorliegende Untersuchung auf eine genauere Analyse zweier Mutationen des *suaveolens*-Plastidoms, einer „gelbgrünen" und einer „weißen". Zum Vergleich wurden normal-grüne *Hookeri*- und ebensolche *suaveolens*-Plastiden in Kombination mit dem gleichen Genom studiert.

Die Methoden der OsO_4-Fixierung, der Schneidetechnik und der elektronenmikroskopischen Untersuchung sind an anderer Stelle ausführlich beschrieben (Leyon 1954a; Leyon und v. Wettstein 1954). Zur Untersuchung gelangten Blattstücke von Rosettenpflanzen, die im Winter im Gewächshaus herangezogen worden waren.

Ergebnisse

Die voll entwickelten, grünen *Hookeri*-Plastiden unter ihrem arteigenen Genom ergeben in Längsschnitten Bilder, wie sie in Abb. 1—3 dargestellt sind. Im Palisadengewebe beträgt ihr Durchmesser 3—6 μ, ihre Höhe 0,5—2 μ. Die Plastiden sind durch eine zuweilen doppelt erscheinende Grenzschicht oder Membran vom Plasma abgegrenzt. Sie zeigen die typische Lamellenstruktur, wobei die Feinlamellen zu sieben bis zehn Schichten höherer Ordnung, die mehr oder weniger den ganzen Chloroplasten durchziehen, zusammengefaßt sind (vgl. Abb. 2).

Abb. 3. Starke Vergrößerung der „Grana". Elektronenoptisch, 74.000 : 1.

Abb. 4. *Suaveolens*-Chloroplast einer gelbgrünen Plastidommutation. Erklärung siehe Text. Z: Zellwand. Elektronenoptisch, 23.000 : 1.

Abb. 5. Wie Abb. 4, jüngeres Stadium. Erklärung siehe Text. Z: Zellwand. Elektronenoptisch, 34.000 : 1.

Die „Grana" treten in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen als besonders gut parallel orientierte und stark elektronenabsorbierende Lamellenpakete verschiedener Größe hervor. Besonders auffallend ist die wenig markante Abgrenzung der Granalamellen von den Stromalamellen, wenn man dies mit den Bildern von *Aspidistra*- und *Hordeum*-Chloroplasten vergleicht. Die Grana liegen zuweilen in Stapeln von zwei oder auch drei Einheiten übereinander, aber diese Anordnung ist nicht häufiger, als einem Zufallsmuster entspricht. Die *Oenothera*-Chloroplasten sind somit im Aufbau denen anderer Objekte ähnlich, wobei sie sich eher an den Typus der Tulpen-, Tabak- und Gerstenchloroplasten (Frey-Wyssling und Steinmann 1953; Cohen und Bowler 1953; v. Wettstein 1954 b, 1955) anschließen, als an den Typus, der bei *Aspidistra* (Leyon 1954 b; Steinmann und Sjöstrand 1953) gefunden wurde. Bei näherer Betrachtung läßt sich noch eine Besonderheit für die *Oenothera*-Plastiden zeigen, die am besten mit Hilfe des Schemas in Abb. 6 erklärt sei. Dieses stellt eine der Schichten höherer Ordnung mit den stark osmiophilen Bereichen, die als Grana bezeichnet werden, dar. Nicht alle Granalamellen setzen sich ins Stroma fort, sondern bilden teilweise in sich geschlossene Doppellamellen. Diese Verhältnisse lassen sich an verschiedenen Stellen der Abb. 1—3 feststellen und werden ganz besonders deutlich in der aufgelockerten Struktur einer gelbgrünen Mutante (vgl. unten). Während in den Granabereichen einer Schicht höherer Ordnung durchschnittlich sechs bis zehn Feinlamellen gezählt werden können, finden sich im Stromabereich vorwiegend nur zwei, drei oder vier Feinlamellen, die häufig paarweise einander zugeordnet sind. Dadurch entstehen mehr oder weniger breite Hohlräume oder Kanäle zwischen den Lamellen, die die granuläre Grundsubstanz der Plastiden enthalten. Es ist weiter zu bemerken, daß die Stromalamellen an ganz verschiedenen Stellen der Grana ansetzen, wie es das Schema zum Ausdruck bringt. Häufig sieht man auch Anastomosen zwischen den Grana- und Stromalamellen. Soweit es die bisherigen Aufnahmen erkennen lassen, scheinen die Grana- und Stromalamellen von einheitlicher und gleicher Dicke zu sein, die in Übereinstimmung mit anderen Objekten zu 60 ± 20 Å gemessen wurde. Auch der Abstand der Lamellen voneinander im Granabereich dürfte von derselben Größenordnung sein (Abb. 3). Obwohl die Einzelheiten des Zusammenhanges von Grana- und Stromalamellen auch bei dem bestuntersuchten Objekt, *Aspidistra*, strukturell noch nicht restlos geklärt sind (vgl. Leyon 1954 b; Steinmann und Sjöstrand 1955) und wir auch für *Oenothera* keine gesicherten Feststellungen in dieser Hinsicht machen können, ist doch ein wesentlicher

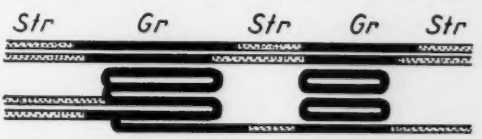


Abb. 6. Schema des lamellaren Aufbaues eines *Oenothera*-Chloroplasten; tiefschwarz: „Grana" (*Gr*), punktiert: Stroma (*Str*). Die Ausdehnung der Granabereiche und der Abstand zwischen ihnen sind nicht im gleichen Maßstab wie die Lamellendicke gezeichnet.

qualitativer Unterschied zwischen den Plastiden von *Aspidistra*, *Hordeum* und *Oenothera*, die ja den verschiedensten Pflanzenfamilien angehören, im Aufbau der Grana- und Stromastruktur festzuhalten: Bei *Aspidistra* ist die zahlenmäßige Dichte der Lamellen im Granabereich und im Stroma praktisch die gleiche (Leyon 1954b; Steinmann und Sjöstrand 1955), bei *Hordeum* stehen durchschnittlich acht Granalamellen drei oder vier groben Stromalamellen gegenüber (v. Wettstein 1955), die, jede für sich, gleichmäßig verteilt an den Grana ansetzen, und schließlich bei *Oenothera* führen vorwiegend vier Stromalamellen, jeweils zu zwei und zwei gepaart, in die Granabereiche herein, wobei der Ansatzpunkt an den Grana beliebig zu sein scheint. Es sei betont, daß diese Unterschiede das Grundsätzliche der Verschiedenheiten festhalten, daß das Bild aber schematisch ist, insofern, als Anastomosen zwischen den Feinlamellen per se und zwischen ihnen und den Schichten höherer Ordnung den Aufbau komplizieren. Nachdem aber solche Verschiedenheiten zwischen den Chloroplasten verschiedener Familien zu finden sind, so wird man auch Unterschiede im Aufbau der Plastiden in verschiedenen Arten einer Gattung erwarten dürfen, und so wurden die *suaveolens*-Plastiden unter dem gleichen Genom, *Hookeri*, geprüft. Sie sind mit diesem Genom voll ergrünungsfähig und lichtmikroskopisch nicht von den *Hookeri*-Plastiden zu unterscheiden. Im wesentlichen ist der submikroskopische Aufbau in beiden Plastidensorten gleich. Die Bilder deuten darauf hin, daß die Abgrenzung der Granabereiche vom Stroma in den *suaveolens*-Plastiden noch weniger scharf als in den *Hookeri*-Plastiden ist und daß die Schichten höherer Ordnung schmäler, also aus einer kleineren Anzahl von Feinlamellen zusammengesetzt sind. Jedoch ist das Material noch zu wenig umfangreich, um gesicherte Schlüsse zuzulassen. In beiden Chloroplastensorten finden sich 1—4 Stärkekörner in typischer Ausbildung. Sehr oft sieht man ein oder zwei rundliche Gebilde mit einem Durchmesser von 0,3—1,0 μ den Plastiden seitlich ansitzen (Abb. 2, *M*), die nach ihrer Struktur und in Analogie mit den Befunden bei *Fucus* (Leyon und v. Wettstein 1954) wohl am ehesten als Mitochondrien gedeutet werden.

Was die normale Entwicklung der *Oenothera*-Plastiden anbelangt, so lassen sich alle bisher gefundenen Stadien in das bekannte allgemeine Bild der Plastidenentwicklung (vgl. Leyon 1954b u. c; v. Wettstein 1954b, 1955) zwanglos einordnen. Die jüngsten Stadien in den Blattmeristemzellen sind ohne Lamellenstruktur und teilweise mit großen Stärkekörnern angefüllt. Die darauffolgenden Stadien sind durch Plastiden mit zwei bis acht Lamellen gekennzeichnet, wobei eine Bifazialität der Lamellen zu beobachten ist. Das Plastidenzentrum wurde bisher nur vereinzelt und nicht mit Sicherheit gefunden. Die mehrfach diskutierten osmiophilen Kugeln sind auch nachzuweisen.

Eine Mutante des *suaveolens*-Plastidoms, die in Kombination mit allen Genomen, mit denen normale *suaveolens*-Plastiden gut ergrünen, zu einer gelbgrünen Laubfarbe führt, ergibt mit der Genomkombination *gaudens*·^{h}*purpurata* in Längsschnitten Bilder von der Art in Abb. 4 und 5. Die dargestellten Plastiden stammen aus einem rein gelbgrünen Blättchen von

1 cm Länge, und ihr Durchmesser variiert zwischen 3 und 6 μ, ihre Höhe zwischen 2,5 und 3,5 μ. Sie sind also im ganzen mehr rundlich als die normalen Plastiden. Die gesamte innere Struktur ist aufgelockert, und bemerkenswert ist die außerordentliche „Hypertrophie" der Plastiden-Grundsubstanz, die zu einer regelrechten Hofbildung um das im Zerfall begriffene Lamellensystem führt. In Abb. 5 sieht man noch den Zusammenhang der acht Schichten höherer Ordnung, die nun durch die Erweiterung der granulären Grundsubstanz besonders weit getrennt liegen. Die Stromalamellen sind bereits teilweise abgebaut, und die geschlossenen Doppellamellen der Grana, sofern man hier überhaupt von einem Unterschied zwischen Stroma- und Granalamellen sprechen kann, sind besonders klar. Gerade aber hier treten die Anastomosen zwischen den Lamellen deutlich hervor, und an manchen Stellen scheinen letztere sogar eine konzentrische Anordnung zu bilden. Auch dort, wo die Schichten nur aus zwei Feinlamellen bestehen, sind sie jeweils paarweise zusammengeordnet und an den Enden vereinigt. Nach allen Befunden (vgl. auch v. Wettstein 1954a) können anscheinend freie Lamellenenden nicht existieren, sondern sie vereinigen sich stets mit benachbarten Lamellen, eine Tatsache, die natürlich von Bedeutung für die Neubildung von Lamellen bei der Chloroplastenentwicklung ist (vgl. Leyon 1954b). Die Hofbildung, die lateral besonders ausgeprägt ist, entsteht durch eine natürliche Quellung der äußersten Chloroplastenschicht, die von einer oder zwei dünnen Membranen begrenzt wird. Diese Schicht ist auch in normalen Chloroplasten vorhanden und wurde besonders klar von Leyon (1954b) dargestellt. Über die Grundsubstanz im Hof und zwischen den Lamellen läßt sich lediglich aussagen, daß sie weit lockerer und wohl gröber granulär als in den intakten Chloroplasten ist, sonst aber der Struktur des umgebenden Plasmas gleicht. Die Frage, ob dabei überhaupt eine Substanzvermehrung und nicht nur eine Auflockerung vorliegt, muß weiter untersucht werden. Der Chloroplast in Abb. 4 dürfte ein weiter fortgeschrittenes Stadium als der in Abb. 3 darstellen. Hier tritt besonders deutlich hervor, daß das Lamellensystem eine geschlossene Einheit bildet und weitgehend von der äußersten Chloroplastenschicht und Membran unabhängig ist. Die Lamellenaggregate der Granabereiche sind offenbar durch ihre dichte Pakkung und Verbindung besonders widerstandsfähig, aber auch sie zeigen schließlich Verquellung. Trotzdem halten die Doppellamellen noch zusammen, so daß eine größere Zahl geschlossener kleiner „Vakuolen" entsteht. Stärkekörner sind in diesen Stadien nicht erkennbar. Möglicherweise sind es diese elektronendurchlässigen „Vakuolen", die bei der Anwendung der Jodreaktion im Lichtmikroskop braun gefärbte Körnchen ergeben. Die osmiophilen Kugeln sind auch in diesen Stadien in geringer Anzahl vorhanden. Schließlich sei noch hervorgehoben, daß die abgebildeten Chloroplasten nicht durch die Fixierung verquollen sind. Gequollene normale Plastiden, wie sie in unseren Fixierungsserien auftraten, geben ein ganz anderes Bild, und vor allem tritt bei ihnen der Hof niemals auf.

Um über die Entwicklung dieser mutierten Plastiden eine Auffassung zu gewinnen, wurden Plastiden in einem 1 mm langen Blättchen aus einem

— soweit festzustellen — rein gelbgrünen Sektor einer Pflanze mit der oben genannten Konstitution geschnitten. Die größten und somit wohl am weitesten entwickelten Plastiden zeigten einen völlig normalen lamellierten Aufbau, der dem Chloroplasten von Abb. 2 entspricht. Auch die „Grana" sind unterscheidbar. Die jüngeren Entwicklungsstadien mit einigen wenigen Lamellen sind ebenfalls normal. In Übereinstimmung mit den lichtmikroskopischen Befunden (Schötz 1933) ist Stärke in keiner der Plastiden zu finden [1].

Eine andere Plastidommutation, weiße *suaveolens*-Plastiden im *Hookeri*-Genom, zeigen in ihrem Endzustand (1—2 cm lange Blättchen) eine Vakuolisierung, die viel durchgreifender als die der gelbgrünen ist. Der Chloroplast ist nur mehr durch seine Umrißform zu erkennen und besteht aus größeren oder kleineren elektronenoptisch leeren Blasen. In 1—3 mm langen, noch schwach grünlichen Blättchen sind kleine Plastiden mit gut ausgebildeten Lamellen festzustellen.

Diskussion

Kommen wir auf die eingangs gestellten Fragen zurück, so ist zunächst auffallend, daß die gelbgrüne Plastidommutation eine annähernd normale Plastidenentwicklung und Differenzierung erreicht und erst danach sich eine Störung in der Funktion, die zu einer Desorganisation der submikroskopischen Struktur führt, bemerkbar macht. Dazu kommt die „Vakuolisierung" der gelbgrünen und weißen Plastiden. In allen untersuchten genisch bedingten Plastidenmutationen der Gerste ist elektronenmikroskopisch (v. Wettstein 1955) und auch lichtmikroskopisch (Gustafsson 1942) keine Vakuolisierung festzustellen, und soweit sie näher analysiert sind, erreichen hier gelbgrüne Plastiden keinen vollentwickelten Zustand. Die Differenzierung ist vor der Granabildung abgebrochen, oder bei weißen Plastiden werden überhaupt keine Lamellen gebildet. Hierbei ist auffallend, daß die Plastiden, auch wenn in ihnen eine Substanz in sehr großen Mengen angehäuft wird, ihre Form und Größe beibehalten, die etwa der normalen entsprechen. Es scheint also ein Unterschied zu bestehen zwischen der Plastidenentwicklung der Gerstenmutanten, deren Chlorophylldefekte auf Gendifferenzen beruhen, und der Entwicklung der defekten *Oenothera*-Chloroplasten, die sich von der grünen Normalform durch Plastidommutation unterscheiden. Infolge Genmutation sind bei der Gerste die strukturelle Differenzierung und der Aufbau der Plastidenstruktur an einer bestimmten Stelle gestört, wobei die Plastiden in den älteren Blattzellen, auch wenn ihre innere Struktur undifferenziert bleibt und desorganisiert ist, keine Veränderungen der äußeren Morphologie aufweisen, die zu ihrem Zerfall oder ihrer Auflösung führen. Bei den Plastidommutanten der Oenotheren sind die strukturelle Differenzierung und der Aufbau der Plastiden weitgehend normal, und erst nachdem der Chloroplast die typische Struktur erreicht hat und vielleicht sogar zur Photosynthese befähigt ist [1], tritt die

[1] Laut brieflicher Mitteilung von Herrn Dr. F. Schötz deuten manometrische Untersuchungen darauf hin, daß mutierte gelbgrüne Plastiden in diesem Zustand bei Belichtung eine Zeitlang CO_2 assimilieren können.

Störung auf. Sie äußert sich in der Quellung und dem Zerfall der ganzen Plastide.

Die zweite eingangs gestellte Frage nach der Unterscheidung der artspezifischen Plastiden an ihrer submikroskopischen Struktur läßt sich für *Oenothera* noch nicht beantworten, aber es konnte festgestellt werden, daß die Plastiden verschiedener Familien der Angiospermen nicht nur quantitative Unterschiede in der Größe der Grana und der Zahl der Lamellen aufweisen, sondern auch solche qualitativer Natur im Aufbau der Stroma- und Granastruktur.

Die weitere Analyse der submikroskopischen Struktur und der Entwicklung der *Oenothera*-Chloroplasten wird zweifellos geeignet sein, die Fragen des Zusammenwirkens von Genom, Plasmon und Plastidom zu beleuchten. Erst dann wird man mit Erfolg der Frage nähertreten können, ob für das unabhängige genetische Element der Plastiden, das Plastidom, ein struktureller Träger im submikroskopischen oder amikroskopischen Bereich verantwortlich gemacht werden kann.

Wir sind Herrn Professor Dr. A. Tiselius für das fördernde Interesse, das er unserer Untersuchung entgegenbrachte, zu ganz besonderem Dank verbunden. Herr Professor Renner hat durch die freundliche Überlassung seines Oenotheren-Sortiments die Herstellung eines großen Vergleichsmaterials ermöglicht, wofür ihm hier zutiefst gedankt sei. Die zugrunde liegenden genetischen Experimente wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt. Die schwedische Akademie der Wissenschaften hat durch Zuwendungen aus „Hahnska donationen" und „Hierta-Retzius' fond för vetenskaplig forskning" die vorliegende Untersuchung ermöglicht.

Summary

1. The general submicroscopic organization of the *Oenothera*-chloroplast is presented and compared with the corresponding structures of other angiosperm genera. Besides quantitative differences in the size of the grana and the number of lamellae, the chloroplasts of *Aspidistra*, *Hordeum* and *Oenothera* differ in the mutual arrangement of stroma and grana layers.

2. A yellow-green mutant of the *suaveolens*-plastidom shows in young leaves normally developed plastids with a well differentiated stroma and grana structure. In older leaves the plastids are destroyed owing to a spontaneous swelling and a "hypertrophy" of the granular substance. The grana lamellae are highly resistant against the vacuolization. A white mutant seems to behave in a similar way.

3. The results are briefly discussed in relation to chloroplast destruction caused by gene-mutation in barley.

Literatur

Cohen, M., and E. Bowler, 1953: Lamellar structure of the Tobacco chloroplast. Protoplasma *42*, 414.

Frey-Wyssling, A., und E. Steinmann, 1953: Ergebnisse der Feinbau-Analyse der Chloroplasten. Vjschr. Naturforsch. Ges. in Zürich *98*, 20.

Gustafsson, A., 1942: The plastid development in various types of chlorophyll mutations. Hereditas *28*, 483.

Leyon, H., 1954a: The structure of chloroplasts III. Exper. Cell Res. *6*, 497.
— 1954b: The structure of chloroplasts IV. Exper. Cell Res. *7*, 265.
— 1954c: The structure of chloroplasts VI. Exper. Cell Res. *7*, 609.
— und D. von Wettstein, 1954: Der Chromatophoren-Feinbau bei den Phaeophyceen. Z. Naturf. *9b*, 471.
Renner, O., 1922: Eiplasma und Pollenschlauchplasma als Vererbungsträger bei den Oenotheren. Z. Abstamm.lehre *27*, 233.
— 1924: Die Scheckung der Oenotherenbastarde. Biol. Zbl. *44*, 309.
— 1936: Zur Kenntnis der nichtmendelnden Buntheit der Laubblätter. Flora *130*, 218.
Schötz, F., 1955: Untersuchungen an panaschierten Oenotheren I. Z. Naturf. *10b*, 100.
Steinmann, E., und F. S. Sjöstrand, 1955: The ultrastructure of chloroplasts. Exper. Cell Res. *8*, 15.
Stubbe, W., 1954: On the analysis of the plastidome of *Oenothera*. VIIIe Congr. intern. de bot. Paris 1954.
Wettstein, D. von, 1954a: Formwechsel und Teilung der Chromatophoren von *Fucus vesiculosus*. Z. Naturf. *9b*, 476.
— 1954b: Formation of the plastid-structures as affected by mutation in the chlorophyll apparatus. Proc. VIIIth Int. Congr. Cell Biol. Leiden 1954.
— 1955: Exper. Cell Res. (in Vorbereitung).

Cycle of Phage Development Within the Bacterial Cell

By

Giuseppe Penso

Department of Microbiology
Istituto Superiore di Sanità, Roma

With 12 Figures

(Received May 23, 1955)

When a susceptible microbe encounters a phage, the following is the sequence of events as far as it is known at present. Within a very short time the phage attacks and fastens itself upon the microbe, and the two become impossible to separate. This adsorption phase is followed, according to the writers on the subject, by a latent period during which there is nothing to be seen at all. But after 10 to 15 min. the lytic action again becomes evident quite suddenly: numerous phages appear inside the microbe, which becomes little more than a bag of parasites. This soon bursts and releases a number of phages which may be hundred of times greater than that present at the beginning of the process.

Writers who have investigated this phenomenon have not been able to determine exactly how and where these phages multiply. The duration of the phenomenon is known: less than 20 to 25 min. elapse between the adsorption of the phage and the bursting of the microbe, at least with the types of phage usually studied. But very little is known about the development of the phage in this short period.

Not even the electron microscope has been much help in solving this problem, though the use of it has revealed the external structure of the phages and the process of adsorption by the susceptible microbe. It shows nothing of the development period between adsorption and the bursting of the microbe, and the phages which reappear in the lysed microbe are morphologically identical with those with which it was infected.

The chief, though not the only, obstacle to observations of the interior of the bacterial cell is the fact that these organisms are almost or quite opaque to electrons; thus there is an "eclipse" of the phage, which is due, as was correctly foreseen by Anderson (1952), to technical difficulties of observation rather than to an actual disappearance of the phage.

Adsorption of the phage is followed by the passage of matter from the phage into the microbe. For this there is both biochemical evidence and that provided by the researches with radioactive isotopes carried out by Putnam and Kozloff (1950), Maaløe and Watson (1951) and Hershey *et al.* (1951). This latter evidence is summed up by Hershey as follows: "Infection of *Escherichia coli* B by its lytic phage T 2 is initiated by the passage of the phage protoplasm (chiefly desoxypentose nucleic acid) into the cell, which leaves most of the phage membrane (chiefly protein) at the cell surface in non-functional form."

This phage membrane, which was observed by chemical means by Hershey, is very probably that observed by Anderson (1949) when he stated that some of the phages adsorbed "are mere blobs on the host cell wall; most of the internal structure of these particles has disappeared, presumably into the protoplasm of the host."

The organism remains opaque to electrons during the adsorption of the phage and the inoculation phase in which matter is passed from the phage to the host cell; the opacity continues until the start of lysis, when it becomes possible for the electrons to penetrate it, revealing crowds of phages ready to escape on the tearing of the cell membrane or the bursting of the entire host cell.

Attempts have been made to deduce the mode of multiplication of the "eclipsed" phage from the study of this phase but, as Hillier (1950) rightly points out, little significance may be attached to the results of researches of this type.

The most recent attempts to overcome this obstacle have consisted in the rupture of the microbes in the "eclipse" phase in order to discover, if possible, traces of the phage in its intermediate stages. Individuals of *E. coli* infected with phages T 2 L and T 2 H were ruptured by explosive decompression by Levinthal and Fisher (1952). During the first half of the latent period nothing of significance was observed, but three minutes before the appearance of the first phages within the cell it became possible to observe ring-shaped particles, called "doughnuts" by these authors, which grow rapidly and have no tails. At the stage at which true phages appear "intermediate particles are seen which appear to be 'doughnuts' with a phage tail attached" (*op. cit.*).

The same authors in collaboration with de Mars and Luria (de Mars *et al.*, 1953) again observed these "doughnuts" by artificial lysis of the bacterial host with proflavine. They were tested with the corresponding antiphage serum and proved able to fix the complement with the antiphage serum, but not to absorb neutralizing antibodies. It was concluded that the "doughnuts" do in fact represent an intermediate stage of the phage, though they do not possess all the phage properties.

Very little of the morphology of these "doughnuts" can be discovered from the micrographs published by these authors, which show bacteria which have been ruptured by violent physical means or lysed by the use of highly active chemical reagents. Nor could the authors offer any opinion

about the location of the "doughnuts" in the bacterial organism, or about the question whether they are isolated or parts of a more complete organism.

Almost all the research which has been carried out in this field has been done on *E. coli* and its phages; this organism is not very transparent to electrons in either the healthy or the infected state, so that no much observation of the interior of its cell is possible. Phage lysis in this organism also takes place so quickly that it is almost impossible to separate the different phases of the process, which may take place at intervals of a few minutes or even fractions of a minute. Phage attack on the healthy cell, virus multiplication, and destruction of the organism may require no more than 20 or 25 minutes. Thus there are two obstacles to research, the opacity of the cell on the one hand and the extreme rapidity of the phenomenon on the other.

Fig. 1. The host cell becomes transparent where the phages are adsorbed.

Fortunately, since the discovery of mycobacteria phages, an entirely virgin field of research has been opened up in which opacity of the host to electrons no longer constitutes an obstacle, since some mycobacteria quite often become transparent to electrons on attack by phages (see Fig. 1), while on the other hand the phage lysis of mycobacteria, unlike that of *E. coli*, is a matter of hours rather than of minutes. With *Mycobacterium minetti* and *Myc. phlei* and their respective homologous phages the adsorption phase lasts 40 min., the latent phase 75 min., and even the bursting phase lasts as much as 75 min.; thus under single-infection conditions the whole cycle lasts at least 3 hours and 10 min. This has made it possible to complete the series of observations of phage infection from start to finish, including the penetration of the virus elements into the bacterial cell, the unknown multiplicative phases, the morphological changes, the reappearance of the classical forms of the phage, the bursting of the host cell, and the release of new phages.

A clear understanding of this complex biological phenomenon requires a short consideration of the structure of phages in general and of *Phagus lacticola* in particular, since this phage has been the object of the most extensive study.

It is already known that phages consist of a head and a tail, of which the head may be spherical or cylindrical, and the tail may be more or less

long, but always ends in a hollowed-out distal apex shaped rather like a bell. Head and tail are not homogeneous, but show a complex structure (Fig. 2). They are bounded by an external, amorphous membrane which is directly continuous from the head to the tail, and which encloses a cavity which is cylindrical, spherical, or spheroidal in the head, and tubular in the tail region. Inside this cavity a series of granules may be seen, arranged in a mulberry-like pattern in the head and a coronet-like pattern in the tail; these granules are clearly defined and so independent of the external membraneous portion that, as will be shown later, the external membrane may sometimes be observed without its granular content and completely deflated.

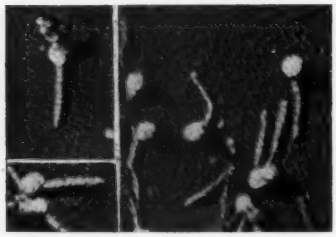


Fig. 2. Free phages consisting of a head and a tail filled with granules.

This may suffice as a rather summary account of the morphology of a phage. It is next necessary to describe the development which take place after the meeting between phage and host cell.

In the first phase phage and host seem to coexist without any effect on one another. This stage is very short in the *coli*-phage system but lasts at least half an hour in the *Mycobacterium*-phage system. It is followed by the adsorption stage, in which the phage approaches the host and sticks to it by its tail. This phenomenon is an irreversible one: once absorption has taken place the phage never becomes detached again.

It is usually stated that the phages may become attached to all parts of the surface of the organism. This may be true in some cases (Fig. 3 *C*) but in others it would seem that the phage is attracted only by part of the surface (Fig. 3 *B*), either the part at one end of the organism (Fig. 3 *A*), or some single part of the exterior, or two different parts (Fig. 1), or both ends simultaneously (Fig. 3 *D*). Individuals in the same phage population may sometimes show different behaviour.

Once the phage has been adsorbed on to the host, its tail pierces the cell wall and penetrates either into the protoplasm or into the virtual cavity between the wall and the cytoplasm, but the penetration is in any case very small and involves only the swollen part of the tail.

For a short time after adsorption the phages retain their normal appearance, but quite soon a loss of thickness (Fig. 4) and turgidity becomes clearly observable and they also become more transparent to electrons. There is a definite impression of some passage of matter from the phage to the host; this corresponds to a decrease of the granules within the phage and their appearance in a free state at the apex of the caudal hollow (Fig. 4), apparently on the verge of passing through it. At the end of this stage only the external membrane is left on the outside of the host, and this membrane appears evacuated and deflated, rather like an empty sack

(Fig. 3). All the contents appear to have passed into the host, and what remains is merely dead detritus which sometimes remains attached to the organism and sometime floats away and disintegrate.

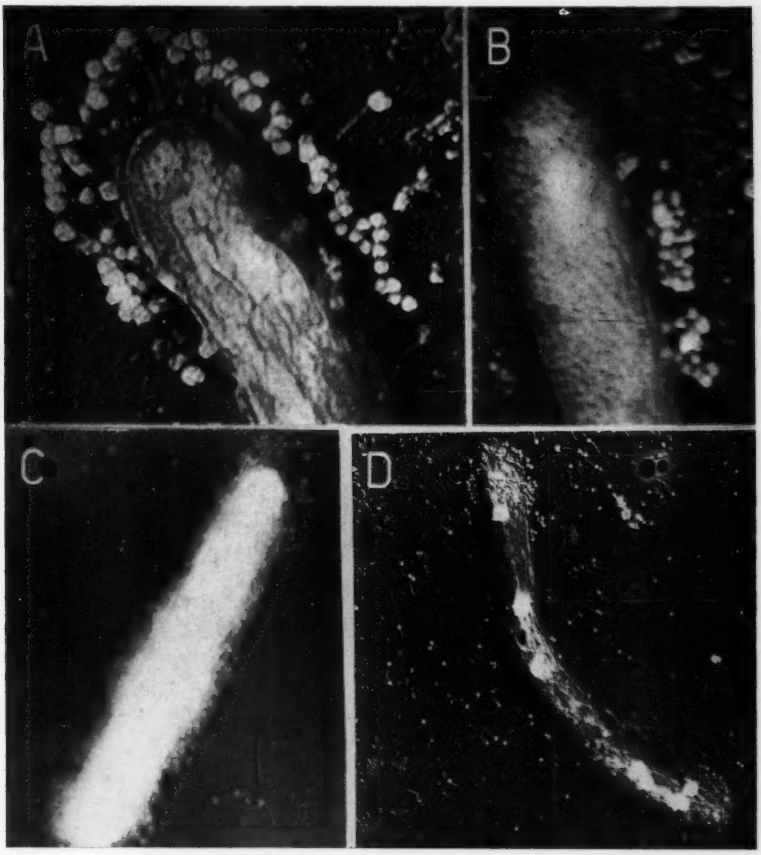


Fig. 3. *A* phages adsorbed at one extremity of the host cell. *B* Phages adsorbed only on a part of the surface host cell. *C* Phages adsorbed over the entire surface of the host cell. *D* Phages adsorbed at both extremities of the host cell.

Thus something does seem to pass from the mature phage to the host cell, and the phage membrane clearly takes no part in the subsequent bacterial lysis. This gives a morphological confirmation of Hershey's statement (1953) that the membrane takes no part in the reproduction of the phage; an instance of morphology confirming biochemistry.

Although this constitutes a triumph of biochemistry, deductions from it must not be pushed too far. It may be admitted that some substance

passes from phage to host and that this substance contains desoxypentose nucleic acid, but to conclude with Anderson *et al.* (1933) from this

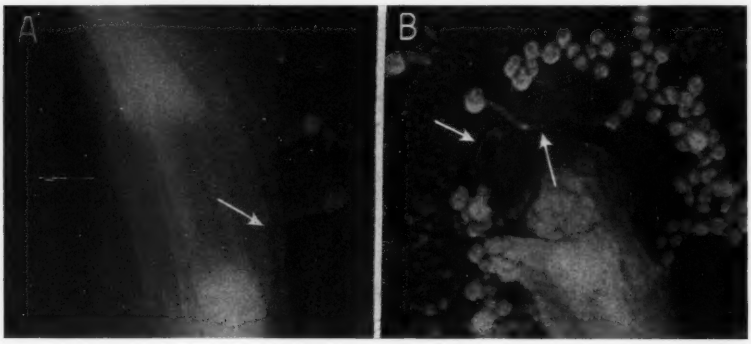


Fig. 4. The granules pass from the phage to the host cell. *A* The phage indicated by the arrow is more deflated than the other one. No granules remain inside it: two granules are outside, near the tip of the tail. *B* The arrow on the left indicates the detached cell wall. The arrow on the right shows a phage whose tail has pierced the membrane, and two granules are clearly visible inside the tail.

that the phage acts "as a syringe whose bulb is packed with DNA ready to be injected when the tip becomes specifically attached to a host cell" is to travel rather too fast. The phage is a living organism, not a con-

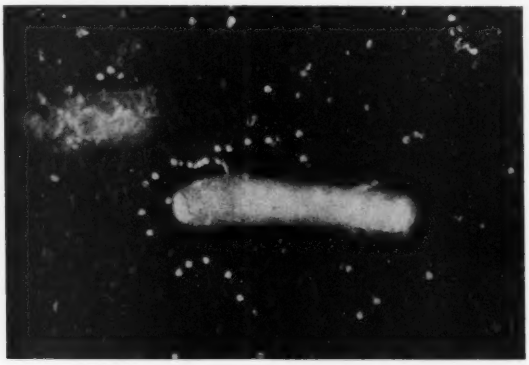


Fig. 3. In the centre: an intact microbe with phages just adsorbed. In the upper left corner can be seen what is left of a microbe with ghost phages having an empty body and an enlarged tail attached at its surface.

glomeration of a pure chemical substance; it inoculates something into the host cell, but something which should not be regarded as a pure chemical compound, even an organic compound, but as chemical material organized

as a living being which is able to grow, multiply, change its shape and structure, and reproduce the parent individual. The fascination of pure biochemistry should not be allowed to obscure the character of general biological phenomena which are frequently repeated in nature.

It is perhaps a preferable description of what occurs to say that the phage, or the particles of which it now consists, pass across into the host cell, leaving their enveloping membrane outside. The actual material concerned is undoubtedly the granules which were present in the body of the phage and were glimpsed in the tail. These granules are clearly to be seen in the complete phage, but not in the evacuated membrane. It seems inescapable that they have passed over to the host. What remains outside is not the phage but its cast-off envelope, the membrane. In the last analysis the phage is represented by the granules: if they are not the phage itself, they may be regarded as something like "phage spores."

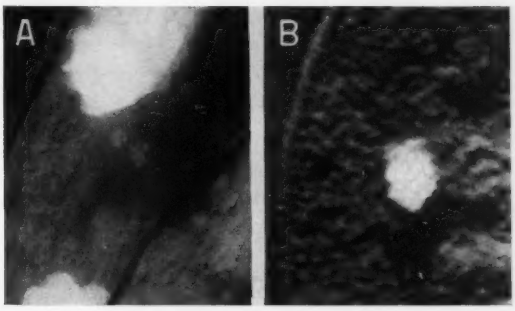


Fig. 6. *A* Moruliform masses. *B* A well defined morula.

The mechanism of release of these particles from their envelope, their migration path and destination, and their development can only be observed statically by the electron microscope, so that no continuous description of the sequence of phases can be given.

There are two serious difficulties in the detection of the release of the granules at the tail of the phage, the extremely small size of the granules and the opacity of the host cell, which in this initial phase is always considerable even in the most favourable cases. Only in the cases in which, through shrinking of the bacterial protoplasm and detachment of the body of the cell from its wall, the tip of the phage could be shown and photographed after it had penetrated the host cell could any observation be made at all. In these cases it was possible to see the granules in the process of emerging from the tip of the phage tail, at least this was the impression received. But in spite of this difficulty of making visible the passage of the granules from the phage to the host, it is impossible to doubt that this transfer does take place.

Once introduced into the protoplasm of the host, these particles begin to collect into moruliform masses of a greater or less number of components,

rounded at first (Fig. 6) but later elongating into rather the appearance of a corn-cob (Fig. 7), which gives the impression of possessing a membrane of its own, though this may be no more than a protoplasmic thickening of the material of the host.

Close observation of the separate components of the moruliform formations shows that they are arranged regularly: each component seems to be influenced by its neighbours in such a way that they assume a polygonal arrangement, the sides of the polygon being determined by the pressure exerted by the nearest components. To repeat the comparison of the last paragraph, the components take up similar relations to those of the grains in a corn-cob.

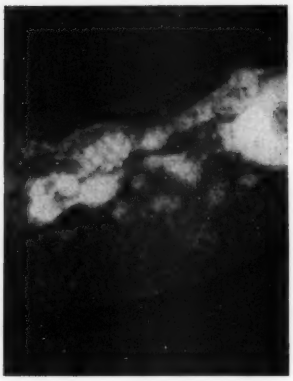


Fig. 7. A more advanced morula which has assumed the shape of a corn-cob.

From the terminal morula of this formation ring-shaped formations similar to those already described are released one by one; they float freely in the protoplasm of the microbe, where they appear to multiply into two or four each (Fig. 8 *A, B, C*), producing new elements which in the end form rosettes (Fig. 9). These "rings" are obviously identical with the "doughnuts" which L e v i n t h a l *et al.* (1952) obtained from the host cell when they burst or lysed it at the appropriate moment.

Thus the nature, origin, and significance of these "doughnuts" is to some extent revealed. They are a developmental stage of the phage; they look ring-shaped (but must in fact be biconcave discs); they are at first

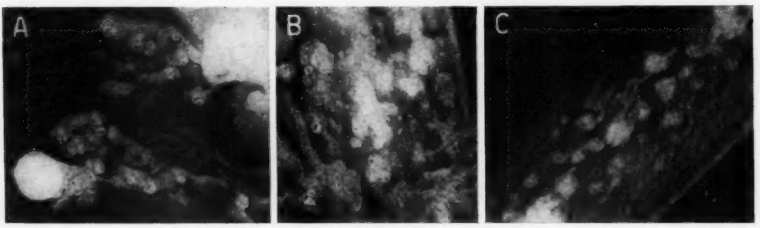


Fig. 8. Free doughnuts in division.

without tails, but a small one very soon appears (Fig. 10 *A*) and elongates into a cilium (Fig. 10 *B*), while the head thickens and the complete phage body develops. This completes the cycle, consisting of entry into the cell by the granular particles, their development, metamorphosis, and reproduction of the original type of adult organism. Thus a true cycle of development of the phage in its host cell has been established.

Once the adult phage has been reformed, the host cell, which now consists of no more than a bag of parasites, breaks in two, splits open, or bursts (Fig. 11), releasing the mature phages which may now recommence their life cycle in a new host.

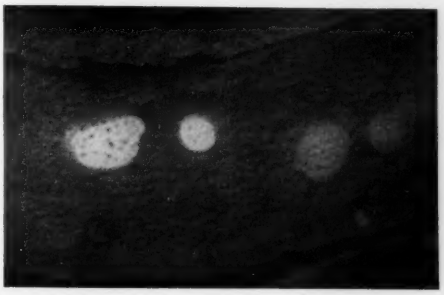


Fig. 9. Rosettes.

The above observations and discussion may be summarized as follows,

1. The phage is a living organism with a characteristic morphology and life cycle.

2. The general morphology of the phage has already been described: the limiting membrane enveloping the head and body of the phage is single and continuous, so that the two parts must be regarded as belonging to a single organism although they are of separate structure.

3. The membrane is a supporting membrane, a sort of exoskeleton, of spherical, cylindrical, or spheroidal shape at the head and tubular round the tail, whose free end is hollowed out. There is a communication between the hollow head and the tabular cilium.

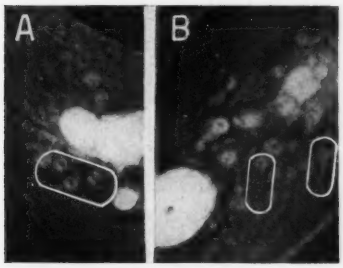


Fig. 10. *A* Doughnuts with a short tail. *B* Doughnuts with a long tail.

4. A set of granular particles is present inside the phage, which push through the membrane in the head region and form the small knobs which can be seen in all the electron micrographs. There is an uninterrupted series of granular particles from the head to the tail in the cilium.

5. The morphology of the mature phage is clearly quite complicated. However, the genetic part of the phage is the internal granular portion alone; the membrane is a mere envelope and outline, which after evacuation of its contents is simply a dead, disintegrating shell.

The granules, described above as the genetic portion of the phage, might just as well be regarded as constituting the phage itself, since once they have penetrated to the interior of the host cell they originate new phages. It has already been suggested that these may be regarded as the "spores" of the phage, if a term of general biology may (improperly) be used for once in the etymological sense of the Greek (σπόρος, "seed"). For the sake of a label and for clarity's sake, perhaps the term "sporo-

phage" may be coined to designate each of these phage particles which penetrate the host cell.

Fig. 12 shows a schematic reconstruction of the cycle described above, as it is to be observed with the electron microscope, together with the terminology suggested for the various phases which have been distinguished.

The sporophage, once inside the host cell, multiplies—the mechanism of this process remains unknown—and gives rise to the formation of a

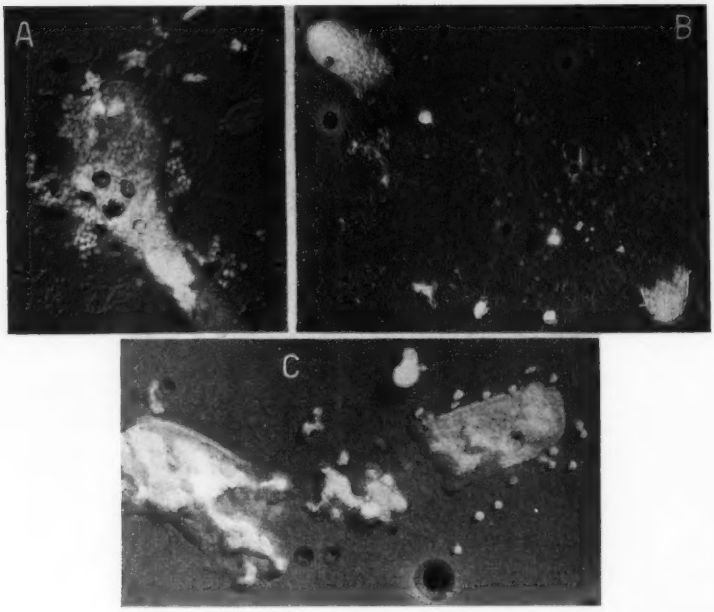


Fig. 11. *A* Bacterium full of phages in process of splitting. *B* Bacterium bursting. *C* Bacterium in stage of breaking up.

morula, the separate components of which are to be considered as phages in a vegetative state, and may thus be called *trophophages* (τρόφος, "nourishment"). These trophophages become swollen and vacuolated, and turn into ring-shaped individuals which multiply further, forming a rosette from which they are liberated one by one and disperse in the protoplasm. The term applied to each of these forms, which correspond to the "doughnuts" of the Americans, is *merophage* (μέρος, "part"). The merophages soon grow a tail and arrive at the final stage of development of the phage: this may be called the *telophage* (τέλος, "end"). The transition from the telophage to the mature phage, ready to recommence the cycle, follows.

This concludes the rough outline of the result of this research. It is worthy of particular note that such a complex cycle of development may

occur in a virus: there is a close correspondence between the phases of this cycle, at least as far as they can be determined, and the phases of the life cycles of other microorganisms. Thus these phenomena do not represent a new order of biological phenomena, but correspond to already known phenomena of general biology. The phages are living organisms which, it may be inferred, are subject to the same general laws as other living organisms.

It is hard to reconcile these results with recent statements made by certain biochemists such as Evans (1953), who speaks of the "process of

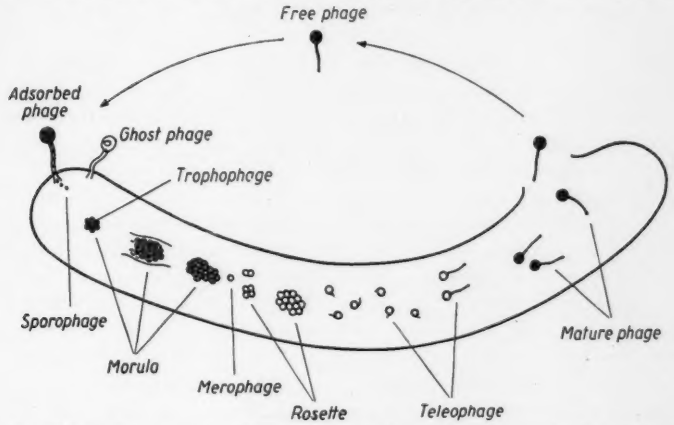


Fig. 12. Schematic reconstruction of the cycle of development of a mycophage within its host cell.

coliphage synthesis," the "synthesis of viral progeny," and "virus synthesis"; it is also hard to see the place and function in the life cycle to which the so-called "prophages" of Lwoff and Gutmann (1950) are to be allotted. It is possible that these biochemists have become so fascinated by the technical ingenuity of their experiments that they sometime forget that they are dealing with biological phenomena, and, having proved the occurrence of certain chemical syntheses in the phenomena, fall into the trap of identifying the one with the other and calling the whole by the name of the part.

Lwoff *et al.* (1953) use the term "prophage" to mean "the form in which lysogenic bacteria perpetuate the power of bacteriophage production" (*la forme sous laquelle les bactéries lysogènes perpétuent le pouvoir de produire des bactériophages*): Lwoff (1953) regards the prophage as "a potential lethal factor, existing as a character of certain genes" (*un facteur létal potentiel, caractère qui appartient à certaines gènes*) and, after a reference to Hershey's (1953) researches quoted above, he concludes by expressing the "opinion that the prophage may possibly be a desoxypentose nucleic acid" (*penser que le prophage est peut-être un acide désoxypentonucléique*).

A lysogenic bacterium, of course, is one which is able to carry about immature phages inside itself; these sometime mature spontaneously and are then released, but they can also be artificially matured by ultra-violet irradiation.

Lwoff and his school suppose (Lwoff 1953) that this immature phage is actually produced by the host, whose "'lysogenic' character, which may well correspond to the prophage, would then have a fixed and constant location on one of the bacterial chromosomes" (*caractère "lysogène", qui semble bien correspondre au prophage, pourrait être fixé en une position determinée d'un chromosome bactérien*).

This is not the place in which to discuss Lwoff's views and those of his numerous pupils and followers, all of whom have contributed in a brilliant series of papers to the progress of researches on the phenomena of bacteriophagy, but on the other hand it seems that there is room for a new hypothesis.

On the supposition that there exist in nature organisms in which the phage is unable to complete its life cycle (but in which, for example, the cycle is blocked at the trophophage or merophage stage, in which the phages are not known to have any lytic power), and in which the phage is able to carry on a subsidiary endoparasitic cycle, analogous to the cycles known to occur in other organisms (it has in fact been observed that the merophages are able to reproduce themselves and give rise to other merophages); on these suppositions (if the cycle stops at this point), the host cell would not burst, and might well carry its parasitic infection with it in dividing as a congenital but not a hereditary condition. It will then be the modification of the environnement of the organism by external and artificial application of chemical or chemophysical interference which allows the trophophages or merophages to evolve further, completing their own life cycle and becoming mature phages in the free and infective state.

These researches, which represent the result of six years' work, offer a new method of approach to the complex biology of the phages, and allow for the first time the use of the expression "cycle of development" in speaking of a virus. Any suggestion of audacity in this use is to a large extent dissipated by the virological papers which have appeared recently in fairly large numbers, and which prove that morphologically distinguishable phases appear in many viruses in the course of their intracellular parasitism and are clearly stages of a regular cycle of development. This cycle is a definitely biological phenomenon, and supplies a confirmation of the living nature of viruses in general and phages in particular.

Summary

The present researches have been made with the *Phagus lacticola* (P. and O.) induced on the acid-fast *Mycobacterium battaglini*. This is an excellent material for the study of the mycobacteriophage system because once infected with the phage it becomes transparent to electrons. *Phagus lacticola*, as other phages, comprises a head and a tail, both covered by

a unique membrane. Inside it is possible to see a certain number of small granules, which, after the phage has been absorbed by the germ, penetrate the cell, leaving outside only an empty membrane. Once inside the cell the granules multiply, giving a moruliform body which later resembles a corn-cob. The round elements of this formation show a very small central vacuole. In time this vacuole enlarges and these elements become larger and detached, assuming an annular shape (doughnuts). Once detached, they multiply in two or four and form a rosette. The single elements detach from the rosette; each one assumes a short flagellum, which then elongates, while the annular element swells and assumes the form of a mature phage, which is freed by rupture of the cell. The phages therefore have a complex cycle of development inside the host: the various phases we have been able to see are in accordance with the cycle of other living organisms and are shown here by a series of electron micrographs.

Literature

Anderson, T. F., 1949: The reaction of bacterial virus with their host cells. Bot. Rev. *15*, 464.

— 1952: Stereoscopic studies of cells and viruses in the electron microscope. Amer. Naturalist *86*, 91.

— C. Rappaport, and N. A. Muscatine, 1953: On the structure and osmotic properties of phage particles. Ann. Inst. Pasteur, Par. *84*, 5.

De Mars, R. J., S. E. Luria, H. Fisher, and C. Levinthal, 1953: The production of incomplete bacteriophage particles by the action of proflavine and the properties of the incomplete particles. Ann. Inst. Pasteur, Par. *84*, 113.

Evans, E. A. jr., 1953: The origin of the components of the bacteriophage particles. Ann. Inst. Pasteur, Par. *84*, 129.

Hershey, A. D., 1953: Intracellular phases in the reproductive cycle of bacteriophage T2. Ann. Inst. Pasteur, Par. *84*, 99.

— C. Roesel, M. Chase, and S. Forman, 1951: Carnegie Inst., Washington Yr. Bk. *50*, 195.

Hillier, J., 1950: Electron microscopy of microorganisms and viruses. Ann. Rev. Microb. *4*, 1.

Levinthal, C., and H. Fisher, 1952: The structural development of a bacterial virus. Biochem. a. Biophys. Acta *9*, 419.

Lwoff, A., 1953: L'induction. Ann. Inst. Pasteur, Par. *84*, 225.

— and A. Gutmann, 1950: Recherches sur un *Bacillus megatherium* lysogène. Ann. Inst. Pasteur, Par. *78*, 711.

Maaløe, C., and J. D. Watson, 1951: The transfer of radioactive phosphorus from parental progeny phage. Proc. Nat. Acad. Sci. *37*, 507.

Putnam, F. W., and L. Kozloff, 1950: The fate of infecting virus particle. J. biol. Chem. (Am.) *182*, 243.

Untersuchungen über die Struktur und Entwicklung der Proplastiden

Von

Kurt Mühlethaler

Institut für Allgemeine Botanik der E. T. H. Zürich,
Laboratorium für Elektronenmikroskopie

Mit 18 Textabbildungen

(Eingelangt am 26. Mai 1955)

1. Einleitung

Die Proplastiden der höheren Pflanzen unterscheiden sich nach Strugger (1950, 1954 a, b) von den übrigen Zellpartikeln dadurch, daß sie in ihrem amöboiden Stroma ein scheibenförmiges, mit Rhodamin B färbbares primäres Granum enthalten. Dies bestätigt einerseits die alte, von Schimper (1883) aufgestellte Kontinuitätstheorie der Plastiden und widerlegt anderseits die Ansicht von Guilliermond (1932), daß diese Körper von Mitochondrien abstammen. Während ihrer Entwicklung zum Chloroplasten machen diese Proplastiden verschiedene morphologische Veränderungen durch, die lichtmikroskopisch von Strugger (1950, 1954 a, b) und seinen Mitarbeitern Kaja (1954) und Grave (1954) untersucht wurden. Sie bestehen vor allem darin, daß sich die primären Grana identisch reduplizieren, wodurch zwei übereinanderliegende Tochtergrana entstehen. Während der folgenden Teilungen sollen einzelne Grana seitlich herausgleiten, wodurch die Entstehung neuer, benachbarter Granensäulen möglich wird. Diese Befunde sind lichtmikroskopisch von Heitz und Maly (1953) sowie von Düvel (1954) nachgeprüft und nicht in allen Teilen bestätigt worden. Umstritten ist vor allem die Struktur der jüngsten Proplastiden. Nach den eben erwähnten Autoren ist die Fluoreszenz dieser Körper zuerst homogen, und eine Differenzierung in Stroma und Granum erfolgt erst später. Heitz und Maly (1953) schlossen daraus, daß in den Frühstadien das Chlorophyll, das die Fluoreszenz verursacht, homogen im Stroma verteilt sei und erst bei einer gewissen Konzentration die Bildung des primären Granums erfolge. Die neueren elektronenmikroskopischen Befunde von Leyon (1954 b) und Heitz (1954), die zeigten, daß die Primärgrana einen kristallgitterartigen Bau aufweisen, sollen diese Ansicht bestätigen. Wir

können uns aber einer solchen Interpretation der EM-Bilder nicht anschließen, weil die chemische Natur der Makromoleküle, die das Primärgranum aufbauen, noch gar nicht bekannt ist. Die Befunde zeigen jedoch, daß dieser Körper nicht mit den später sich bildenden Grana vergleichbar ist.

Nach Leyon (1953, 1954a, b) geht die Entwicklung der Plastiden von undifferenzierten osmophilen Granulis aus, die in den embryonalen Zellen recht zahlreich vorhanden sind. Die Bildung des kristallinen Primärgranums soll erst später erfolgen. Wichtig ist vor allem die Beobachtung, daß bei der späteren Entwicklung die Stromalamellen im Kontakt mit dem Primärgranum heranwachsen. Eine Teilung desselben, wie sie von Strugger (1950, 1954a, b) beobachtet wurde, konnte bisher im EM noch nicht gesehen werden.

Diese zum Teil widersprechenden Befunde der erwähnten Autoren veranlaßten uns, vor allem folgende drei Probleme näher zu untersuchen:

1. Wie unterscheiden sich die embryonalen Proplastiden von den übrigen Zellpartikeln, wie z. B. Mitochondrien, Sphärosomen etc.?
2. Enthält der Proplastid von Anfang an ein Primärgranum, oder wird dieses erst später aus dem Stroma gebildet?
3. Wie entwickeln sich die Stromalamellen und die dazwischen eingeschlossenen Granensäulen?

2. Experimentelles

Als günstigste Objekte der bisherigen Untersuchungen erwiesen sich die Blätter von *Agapanthus umbellatus, Chlorophytum comosum, Dracaena draco* und *Aspidistra elatior* (Strugger 1954, Heitz und Maly 1954, Leyon 1954). Am besten ließen sich die Blätter von *Aspidistra elatior* fixieren und schneiden, da sie keine Ca-oxalat-Raphiden und wenig Schleim enthalten. Aus diesem Grunde wurde meistens mit *Aspidistra* gearbeitet. Vergleichende Beobachtungen an den übrigen Pflanzen zeigten aber, daß die Struktur und Entwicklung in allen vier Pflanzen analog ist. Als Fixierungsmittel wurde gepuffertes 1% Osmiumtetroxyd verwendet, wie es von Palade (1952), Porter und Kallman (1953) und Rhodin (1954) in die elektronenmikroskopische Technik eingeführt wurde. Die Fixierungsdauer der flach angeschnittenen Blätter von 5, 10, 15 und 20 mm Länge betrug 4 Stunden bei einer Temperatur von 5° C. Anschließend wurden die Objekte in Tyrodelösung gewaschen, bei 5° C durch eine Alkoholreihe entwässert und schließlich in Methacrylat eingebettet. Zur Herstellung der Schnitte verwendeten wir ein LKB-Mikrotom, Typ Sjöstrand. Die Schnitte wurden ohne Entfernung des Einbettungsmittels im Philips Elektronenmikroskop untersucht.

3. Die Partikelpopulation der jungen Pflanzenzelle

Für die verschiedenen Gestaltungsvarianten der Zellpartikel hat Küster (1951) folgende Einteilung vorgeschlagen: Die Körnchenform unterteilt er in Chondriosomen (= Mitochondrien in tierischen Zellen) und sphärische Mikrosomen (= Sphärosomen nach Dangeard 1919), die

Körnerreihen bezeichnet er als Chondriomiten, eingeschnürte, an Teilungsstadien der Plastiden erinnernde Formen als Diplosomen und die fädigen Formen als Chondriokonten. Außer diesen Bezeichnungen existieren in der Literatur zahlreiche Synonyme, wie z. B. Lipochondrien, Plastosomen, Sphäroblasten, Cytosomen usw. Diese Einteilung nach morphologischen Gesichtspunkten ist nicht sehr zweckmäßig, da sich die Partikel je nach dem physiologischen Zustand der Zelle stark verändern können (Buvat 1953). Wie aus den Arbeiten von Claude (1940) hervorgeht, sind einzelne dieser Plasmapartikel Träger wichtiger Fermente der biologischen Oxydation und können, wie Marquardt (1952) nachwies, auch als extranucleäre Erbträger angesehen werden. Da ihre Funktion in der tierischen und pflanzlichen Zelle im wesentlichen die gleiche sein dürfte, erscheint es zweckmäßig, eine einheitliche Terminologie zu benützen. So werde ich im folgenden an Stelle der Bezeichnung Chondriosomen ausschließlich den Ausdruck Mitochondrien verwenden. Der bisher in der botanischen Literatur gebräuchliche Terminus „Mikrosomen", mit dem man die lipophilen Elemente des Cytoplasmas bezeichnet, muß ebenfalls fallengelassen werden, da der gleiche Ausdruck heute für die submikroskopischen basophilen Teilchen des Plasmas Eingang in die Literatur gefunden hat. Als zweckmäßige Bezeichnung für diese Partikel hat Perner (1953) den Namen Sphärosomen, den Dangeard 1919 geprägt hat, vorgeschlagen, den wir ebenfalls übernehmen werden.

Neben den Mitochondrien und Sphärosomen bilden die Proplastiden eine weitere Gruppe von Zellbestandteilen, deren Entwicklung im folgenden eingehend beschrieben werden soll. Als unbelebte Einschlüsse kommen vor allem Lipoidtröpfchen, die oft sehr zahlreich im Plasma suspendiert sind, sowie Kristalle in den Zellen vor. Die Untersuchungen über die Struktur des Grundcytoplasmas der Pflanzenzelle stehen erst am Anfang, und es sollen daher im folgenden nur einige allgemeine Hinweise über die neueren Anschauungen, wie sie uns das EM vermittelt hat, erwähnt werden. Für eine allgemeine Übersicht sei auf das neue Buch von Frey-Wyssling (1955) verwiesen.

a) Grundcytoplasma

Die Anschauungen über den Feinbau des Cytoplasmas, „eine von feinen Körnchen durchmengte farblose Flüssigkeit", wie sie im Anfang der cytologischen Forschung von Mohl (1844) bezeichnet wurde, haben seither manche Wandlung erfahren. Die meisten Theorien, so vor allem die Wabentheorie von Bütschli (1892) und die Haftpunkttheorie von Frey-Wyssling (1938), stützten sich zur Hauptsache auf die kolloidchemischen Erkenntnisse. Erst die neuere EM-Forschung hat uns einen direkten Einblick in die Struktur dieses Stoffes ermöglicht. Wie aus den Arbeiten von Palade (1953, 1955), Palade und Porter (1954), Porter (1954), Sjöstrand (1953) und Bernhard, Gautier und Rouiller (1954) hervorgeht, ist das Cytoplasma nicht nur als homogenes, netzartiges Molekulargerüst anzusehen, dessen Maschen mit wässerigen Lösungen und

Lipoiden gefüllt sind. Wie die Aufnahmen 1 und 2 zeigen, weist es einen vielgestaltigen komplexen Bau auf, dessen einzelne Funktionen wir noch nicht kennen. In diesem Schnitt durch eine embryonale Blattzelle von *Aspidistra elatior* ist im Cytoplasma ein kompliziertes Vakuolensystem vorhanden, das in seiner Struktur dem endoplasmatischen Retikulum von Palade und Porter (1954) ähnlich sieht. Dazwischen finden wir in der Grundsubstanz einzelne feine Stränge und zahlreiche osmophile Körnchen von 80 bis 150 Å Durchmesser (Ultramikrosomen). Einzelne Plasmabezirke können unter Umständen auch durch Doppelmembranen von der übrigen Zelle abgeschlossen sein. Diese Struktur ist in fortwährendem Umbau begriffen, so daß je nach Alter und physiologischem Zustand der Zelle sich der Bauplan ändert.

b) Mitochondrien

Neuere Untersuchungen und zusammenfassende Referate über pflanzliche Mitochondrien sind von folgenden Autoren veröffentlicht worden: Du Buy und Lackey (1950), Newcomer (1951), Chayen und Miles (1953), Millerd und Bonner (1953), Ritchie und Hazeltine (1953) und Goddard und Stafford (1955). Aus diesen Arbeiten geht hervor, daß sich zum mikroskopischen Nachweis in der Zelle vor allem die Janusgrün-B-Färbung eignet. Eine interne Struktur ist aber bei diesen kleinen Objekten im Lichtmikroskop nicht zu erkennen. Erst die neueren elektronenmikroskopischen Untersuchungen haben gezeigt, daß sie typische Innenstruktur aufweisen und dadurch von den übrigen Zellpartikeln deutlich zu unterscheiden sind (Palade 1953, 1955, Palade und Porter 1954, Sjöstrand und Hanzon 1954, Rhodin 1954). Bereits sind zwei verschiedene Typen, nämlich solche mit konzentrisch angeordneten Doppellamellen und solche mit einem quergestellten Lamellensystem, beobachtet worden, die von Palade (1953, 1955) als Cristae mitochondriales bezeichnet werden. Es handelt sich hier offenbar um zwei funktionell verschiedene Typen. Bei einer chemischen Analyse der Mitochondrienfraktion, welche durch fraktionierte Zentrifugation aus dem Zellhomogenat gewonnen wurde, gelingt es aber nicht, die physiologischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Mitochondrientypen zu fassen. Es darf als gesichert gelten, daß die verschiedenen Fermentsysteme, wie z. B. die Cytochromoxydase, Katalase, Arginase, Lipase etc., in diesen Körpern lokalisiert sind (Lang 1952). Nach Perner (1952) können aber nicht nur die Mitochondrien, sondern auch die Sphärosomen Träger solcher Fermente sein.

In Abb. 1 ist ein Schnitt durch eine junge Mesophyllzelle von *Aspidistra elatior* wiedergegeben, welcher die verschiedenen Plasmabestandteile zeigt, wie sie in pflanzlichen Zellen vorhanden sind. Die Mitochondrien (*M*) sind vom umgebenden Cytoplasma durch eine Membran abgegrenzt und können rundliche bis gestreckte Formen aufweisen (Abb. 2). Ihre Größe schwankt zwischen 0,5 und 1 μ. Gleich wie bei tierischen Zellen ist eine Innenstruktur erkennbar, die aus vereinzelten Doppellamellen besteht, die sich zum Teil zu Bläschen ausweiten können (Abb. 3). Verglichen mit den Mitochondrien aus der Leberzelle (Rhodin 1954) sind sie also viel primitiver gebaut.

c) Sphärosomen

Wie bereits erwähnt, ersetzt dieser Ausdruck die frühere Bezeichnung „Mikrosomen". Noch bis vor kurzem wurden diese granulären Einschlüsse der Zelle als tote, fett- oder lipoidartige Ausscheidungsprodukte des Cytoplasmas angesehen (Küster 1931). Da ihre Größe zwischen 0,4 und 0,9 μ variiert, konnte man sie im Lichtmikroskop nur schlecht von den Mitochondrien unterscheiden. Nach Perner (1952a, b, c), Perner und Pfefferkorn (1953), Sorokin (1938, 1941, 1955), Drawert (1952, 1953) können sie durch Vitalfärbung mit Berberinsulfat, Phosphin 3R und Nilblausulfat elektiv angefärbt werden. Spezifisch ist auch die Nadi-Reaktion, wobei durch die Mitwirkung der Cytochrom-Oxydase aus α-Naphthol und Dimethyl-*p*-Phenylendiamin Indophenolblau synthetisiert wird. Nur die Sphärosomen bilden diesen Farbstoff, während die übrigen Zellpartikel ungefärbt bleiben. Diese Reaktion und die Verminderung des Sauerstoffverbrauches nach der Berberinfärbung deuten nach Perner (1952c) darauf hin, daß die Atmungsfermente nicht in den Mitochondrien, sondern in den Sphärosomen lokalisiert sind.

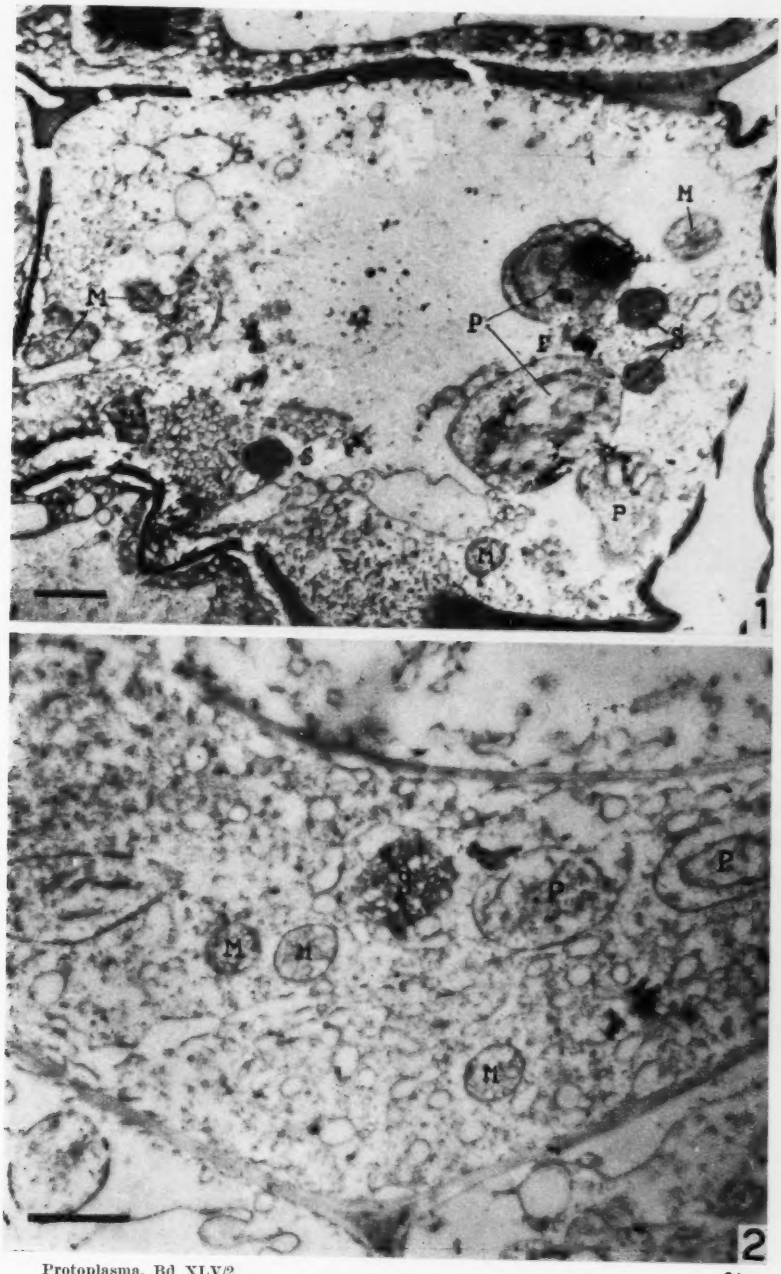
Infolge ihres hohen Lipoidgehaltes erscheinen die Sphärosomen nach der Osmiumtetroxydfixierung in den Dünnschnitten als dunkle Körper (in Abb. 1 als „*S*" bezeichnet). Die Gebilde zeigen eine komplizierte Innenstruktur, deren Bauplan noch nicht abgeklärt ist (Abb. 4). Damit wird die frühere Auffassung von Guilliermond (1932) und seiner Schule widerlegt, welche diese Körper als reine Fetttröpfchen paraplasmatischer Herkunft ansahen.

In den jungen Zellen findet man zahlreiche osmophile Granula ähnlicher Größe und Form, und Leyon (1954a) hat bereits darauf hingewiesen, daß es sich bei diesen Körpern um Frühstadien der Proplastiden handeln könnte. In der vorliegenden Untersuchung wurde daher speziell darauf geachtet, ob sich diese osmophilen Granula der embryonalen Zellen zu Proplastiden entwickeln oder ob sie ihre sphärische Form beibehalten und daher in die Gruppe der Sphärosomen eingereiht werden müssen. Unsere Beobachtungen ergaben, daß es in den jüngsten Zellen nicht möglich ist zu entscheiden, welche Plasmakörper sich später zu Sphärosomen und welche sich zu Proplastiden entwickeln. Nach der Osmiumfixierung sind alle Körper gleich geschwärzt und weisen auch die gleiche Größe auf (Abb. 6). Später können die Sphärosomen von den Proplastiden aber gut unterschieden werden, da bei den ersteren ein Stromabelag fehlt (Abb. 4). Wie die Mitochondrien morphologisch und physiologisch voneinander verschie-

---

Abb. 1. Blattzelle von *Aspidistra elatior* mit verschiedenen Zellbestandteilen, wie Mitochondrien (*M*), Sphärosomen (*S*), Proplastiden (*P*) und Fetttröpfchen (*F*). Vergr. 11.400×.

Abb. 2. Junge Blattzelle von *Aspidistra*. Das Cytoplasma weist ein zusammenhängendes Vakuolensystem auf, das dem endoplasmatischen Reticulum gleicht. Vergr. 15.900×.


M
M
P
P
P
M
1
P
P
M
M
M
2

den sein können, so werden wohl auch bei den Sphärosomen funktionell verschiedene Typen existieren.

d) Fetttröpfchen

Beinahe in jeder Zelle findet man neben den bereits besprochenen Partikeln unregelmäßig begrenzte, durch OsO_4-Fixierung stark geschwärzte Fett- und Lipoidtröpfchen. In einzelnen Zellen können sie sehr zahlreich sein, während sie in anderen nur vereinzelt auftreten. Im Gegensatz zu den Sphärosomen zeigen sie keine Innenstruktur, sondern erscheinen homogen (Abb. 5). Eine umhüllende Membran fehlt, die darauf hindeuten würde, daß sie in einem Plasmapartikel entstehen. Die Fetttropfen müssen infolgedessen direkt vom Cytoplasma ausgeschieden werden. Ob es sich dabei um Assimilationsprodukte oder um pathologische Erscheinungen handelt, ist noch nicht genau abgeklärt. Hilwig und Schmitz (1951) zeigten, daß in Fibroblastenkulturen, deren Atmung durch Berberin gehemmt wird, sofort eine starke Verfettung der Zellen eintritt. Dieser Befund wird so gedeutet, daß durch die Unterdrückung der Atmung eine vermehrte Glykolyse verursacht wird, welche sich in einem Auftreten von Lipoidtropfen im Plasma äußert (Lettré 1951).

e) Proplastiden

Im EM können die Proplastiden nur im Dünnschnitt beobachtet werden, und in vielen Fällen ist daher das primäre Granum nicht getroffen. Die jüngsten Proplastiden enthalten jedoch meist zahlreiche Stärkekörner (Abb. 8—10) sowie Fett- oder Lipoidtröpfchen (Abb. 11), was eine Identifizierung gleichwohl ermöglicht.

Abb. 3. Mitochondrien. Die Innenstruktur besteht aus Doppellamellen und Vakuolen. Vergr. 11.400×.

Abb. 4. Sphärosom. Nach der OsO_4-Fixierung erscheinen die kugeligen Körper kontrastreicher als die Mitochondrien. Vergr. 18.200×.

Abb. 5. Fetttröpfchen. In Form und Größe sind diese Teilchen sehr variabel. Vergr. 9800×.

Abb. 6. Osmophile Granula aus der Blattbasis eines 1 cm langen Blattes. Eine Unterscheidung zwischen Proplastiden und Sphärosomen ist noch nicht möglich. Vergr. 10.200×.

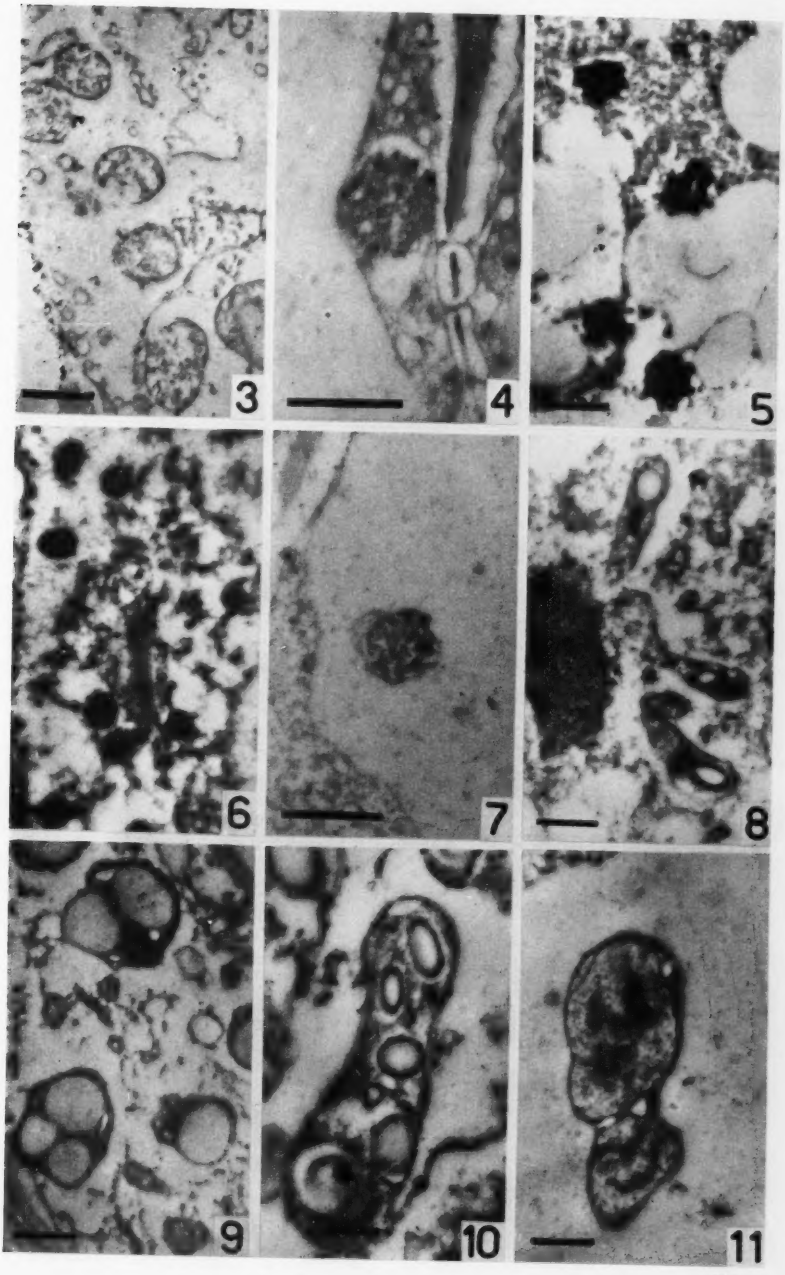
Abb. 7. Proplastid. Um das primäre Granum herum entwickelt sich ein feiner Stromabelag. Vergr. 16.000×.

Abb. 8. Amöboide Proplastiden mit beginnender Stärkebildung. Vergr. 9700×.

Abb. 9. Amyloplastische Proplastiden aus der Spitze eines 1 cm langen Blattes. Vergr. 10.000×.

Abb. 10. Amyloplastischer Proplastid mit zahlreichen Stärkekörnern. Vergr. 11.600×.

Abb. 11. Außer Stärke wird im Proplastiden auch Fett oder Lipoid aufgebaut, das in Form kleiner Tröpfchen im Stroma gespeichert wird. Vergr. 10.000×.


3
4
5
6
7
8
9
10
11

In den embryonalen Zellen konnten wir die von Strugger (1950) beschriebenen, in Stroma und Grana differenzierten Proplastiden nicht finden. Im Protoplasma sind nur die von Leyon (1954a) beschriebenen osmophilen Granula vorhanden, deren Größe zwischen 0,3 und 0,9 μ schwankt (Abb. 6). Diese Beobachtungen müssen so interpretiert werden, daß ein Teil dieser osmophilen Granula den primären Granen entsprechen dürfte. Zum Teil enthalten sie bereits kleine, stark geschwärzte Einschlüsse, entsprechend den Lipoidtröpfchen der Chloroplasten (Abb. 6). Solche Einschlüsse fehlen in den Sphärosomen und Mitochondrien vollständig, was ebenfalls dafür spricht, daß sich ein Teil der osmophilen Partikel später zu Plastiden entwickelt. Sie sind aber in Form und Größe einander so ähnlich, daß sie im Elektronenmikroskop nicht voneinander unterschieden werden können. Die Theorie von Guilliermond (1932), daß sich die Chloroplasten aus Mitochondrien entwickeln, entbehrte daher nicht ganz der experimentellen Grundlage, da damals Sphärosomen und Mitochondrien nicht unterschieden werden konnten. In ihrem chemischen Aufbau müssen die osmophilen Granula, je nachdem sie sich später zu Sphärosomen oder Proplastiden entwickeln, grundsätzlich verschieden sein. Der kernunabhängige Erbgang der Plastiden, wie er durch die klassischen Arbeiten von Renner (1934) sowie von Correns und Wettstein (1937) gefunden wurde, kann nicht angezweifelt werden.

In der ersten Phase der Entwicklung zum Plastiden bildet sich um den osmophilen Körper herum ein Stroma. Wie Strugger (1950) bereits beobachtete, ist diese Hülle amöboid (Abb. 8). Sofort treten an zahlreichen Stellen im Stroma kleine Fett- oder Lipoidtröpfchen und Stärkekörner auf. Die Fetttröpfchen können vereinzelt auch im primären Granum auftreten, das einen kristallgitterartigen Aufbau besitzt (Heitz 1934, Leyon 1954b).

Sobald die Proplastiden Stärkekörner enthalten, bezeichnet man sie nach Strugger (1950) als amyloplastische Proplastiden. In dieser Phase der Entwicklung ist oft das ganze Stroma mit Stärkekörnern angefüllt (Abb. 9 und 10). Diese selbst weisen im EM keine Innenstruktur auf, son-

---

Abb. 12. Entwicklung der Stromalamellen aus dem primären Granum. Vergr. 15.500×.

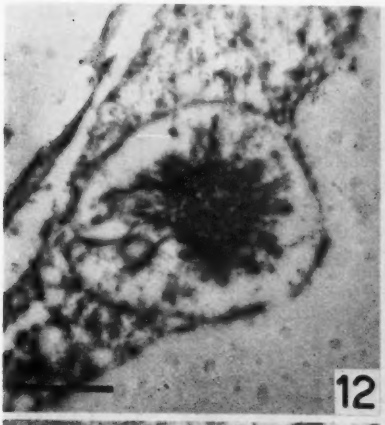
Abb. 13. Späteres Stadium der Lamellenbildung. Vergr. 14.700×.

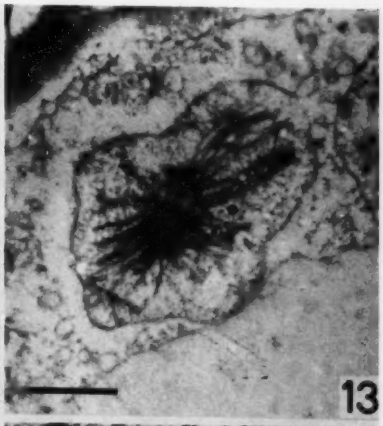
Abb. 14. Die ursprüngliche Stromasubstanz wird zwischen den auswachsenden Lamellen eingeschlossen. Vergr. 12.500×.

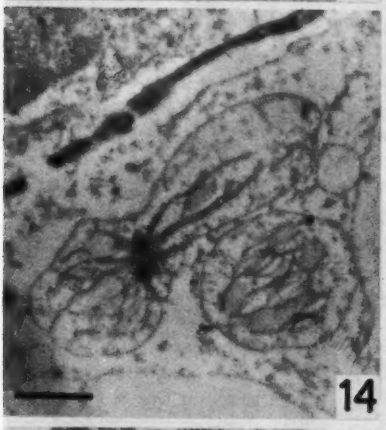
Abb. 15. Stadium des ergrünenden Chloroplasten. Die Verteilung der Stromalamellen ist noch unregelmäßig. Vergr. 16.300×.

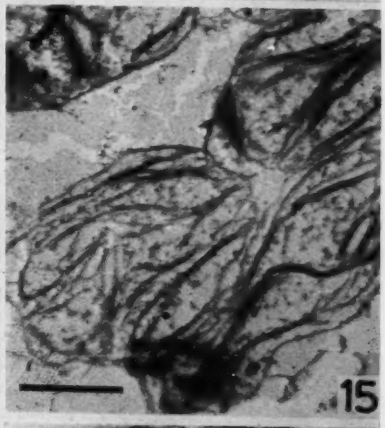
Abb. 16. Ausgewachsene Chloroplasten von *Polygonatum* mit durchgehender Granensäule. Vergr. 7000×.

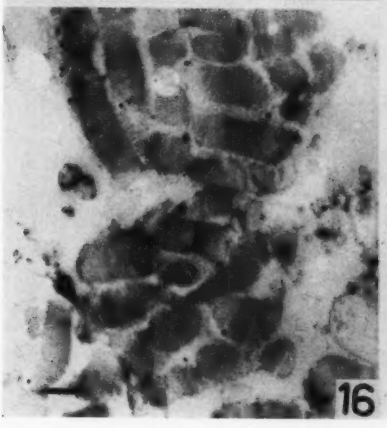
Abb. 17. Schnitt durch einen jungen Chloroplasten von *Agapanthus umbellatus*. Vergr. 12.600×.


12


13


14


15


16

17

dern erscheinen homogen, wie das bereits in einer anderen Arbeit gezeigt wurde (Mühlethaler 1955).

Die nächste Entwicklungsphase ist die Bildung der Stromalamellen, die vom Primärgranum aus erfolgt (Leyon 1954b).

Solche Stadien sind in Abb. 12—15 wiedergegeben. Zuerst sind es nur wenige Lamellen, die auswachsen, aber im Laufe der Entwicklung werden zwischen die früheren Schichten immer neue eingeschoben. Eine bevorzugte Wachstumsrichtung ist dabei nicht festzustellen. Parallel mit dieser Entwicklung werden die aufgespeicherten Reservestoffe wieder abgebaut, und in älteren Stadien, wo bereits zahlreiche Lamellen vorhanden sind, fehlen sie ganz (Abb. 15). Aus diesen Beobachtungen geht also hervor, daß die Stromalamellen die Stoffe aufnehmen, die ursprünglich im primären Granum lokalisiert waren. Sobald das Lamellensystem fertig ist, läßt sich nämlich kein zentraler Körper mehr erkennen. Bis zu diesem Moment ist im EM noch keine Granenstruktur zu beobachten. Eine Konzentration des Chlorophylls in den Granen ist fluoreszenzoptisch bei den ergrünenden Plastiden schon nachweisbar (Heitz und Maly 1953, Strugger 1950, 1954, Düvel 1954). Die Bildung der Granen muß offenbar zusammen mit der Entwicklung der Stromalamellen erfolgen. Nach Strugger (persönliche Mitteilung) sollen die Granenscheibchen nach der identischen Reduplikation auf den Stromalamellen, die als Trägerschicht dienen, auseinandergleiten. Eine Bestätigung dieser Ansicht ließ sich aus unseren Bildern bisher nicht erkennen. In einigen Aufnahmen sieht es eher so aus, wie wenn sich die Stromalamellen in den Granenbezirken lokal aufspalten würden. Die Einlagerung des Chlorophylls in den Granen ist von Frey-Wyssling und Steinmann (1953) diskutiert worden. Dieses Problem bedarf aber noch einer genaueren Abklärung.

Die auf diese Weise differenzierten Plastiden teilen sich anschließend in zwei Jungchloroplasten. Ob es bei diesem einen Teilungsschritt bleibt oder ob die beiden Jungchloroplasten weitere Teilungen durchführen, ist noch nicht abgeklärt. Aufnahmen von solchen Jungchloroplasten sind in den Abb. 16 und 17 wiedergegeben. In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen von Cohen und Bowler (1953), Leyon (1954a), Steinmann und Sjöstrand (1955) fanden wir eine durchgehende Lamellierung des Stromas und der Granen (Abb. 16 und 17). Die Granensäule bei *Polygonatum* weist keinen Unterbruch auf, wie das bei lichtmikroskopischen Untersuchungen zum Teil gefunden wurde (Strugger 1951, Heitz 1936). Offenbar gibt es zwei verschiedene Typen, solche mit durchgehenden Granensäulen und solche mit linsenförmig begrenzten Granenpaketen.

Der ganze Entwicklungszyklus ist in Abb. 18 schematisch aufgezeichnet. Er beginnt in der embryonalen Zelle mit einem osmophilen Granulum, das im Streuvermögen gegenüber den Elektronen, in seiner Größe und Speichervermögen von OsO_4 dem primären Granum entspricht. Um diesen Körper herum bildet sich ein weniger dichtes Stroma, in welchem Reservestoffe in Form von Stärke und Fett angehäuft werden. Aus dem Primärgranum wachsen die Stromalamellen aus, die in großer Zahl den ganzen Chloroplasten durchziehen. Mit der Konzentration des Chlorophylls in den Gra-

nen ist die Entwicklungsphase abgeschlossen und die Teilung der Chloroplasten beginnt. Die beiden Jungchloroplasten werden in den Assimilationsprozeß eingeschaltet, wobei aber noch nicht bekannt ist, wie lange sie funktionstüchtig bleiben.

4. Diskussion

Auf die Schwierigkeiten, die sich bei einer lichtmikroskopischen Untersuchung der Frühstadien der Plastidenentwicklung ergeben, ist bereits hin-

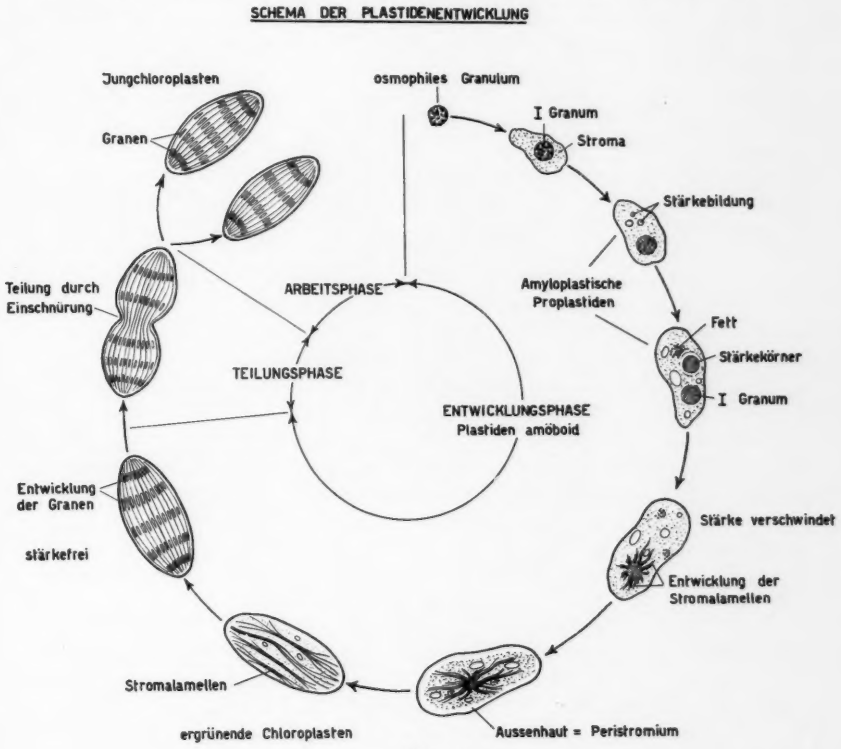


Abb. 18.

gewiesen worden. Erst die Anwendung des Fluoreszenzmikroskops und die Verwendung von spezifischen Vitalfarbstoffen hat eine Unterscheidung der Proplastiden von den übrigen Zellpartikeln ermöglicht (Drawert 1952, 1953, Strugger 1954b). Die lichtoptische Beobachtung hat gegenüber der elektronenmikroskopischen den großen Vorteil, daß der Zellinhalt in seiner ganzen Tiefe systematisch beobachtet werden kann, während im EM nur eine 200—500 Å dicke Zone vorliegt. Die Proplastiden können also nicht als Ganzes, sondern nur im Schnitt beobachtet werden. So konnten wir bis jetzt Teilungsstadien der frühen Proplastiden, wie sie von Strugger

(1954 b) beschrieben wurden, nicht auffinden. In keinem Proplastiden sind zwei oder mehr primäre Granen beobachtet worden. Auch deren genaue Form bleibt an Hand von Serienschnitten noch abzuklären. Strugger (1954 a) beschreibt sie als scheibenförmig, aber in allen Präparaten, die wir beobachteten, erschien das primäre Granum mehr oder weniger isodiametrisch. Im Gegensatz zu den Befunden von Heitz und Maly (1953) fanden wir, daß schon die frühesten Stadien einen zentralen Körper enthielten. Ihre Ansicht, daß zuerst ein amorphes Stroma existiert, in dem das Chlorophyll aufgebaut wird, das bei einer bestimmten Konzentration durch Kristallisation zur Bildung des primären Granums führt, ist mit diesem Befund nicht vereinbar. Unsere Untersuchung bestätigt vielmehr die Resultate Struggers (1954 b), der das primäre Granum als kontinuierliches Element bei der Vererbung ansieht. Wie unsere Aufnahmen zeigen (Abb. 7), entwickelt sich das Stroma erst sekundär, während das primäre Granum in seiner Form und Größe gleichbleibt. Nach unseren Befunden können die Beobachtungen von Heitz und Maly (1953) sowie von Düvel (1954), daß die jüngsten Stadien homogen fluoreszieren, so erklärt werden, daß in diesem Zeitpunkt die dünne Stromaschicht um das Granum herum noch gar nicht erkennbar ist. Für die gleichmäßig fluoreszierenden Körper in den Tunicazellen des Urmeristems von *Elodea canadensis* gibt Düvel (1954) einen Durchmesser von 0,9 μ an, der angenähert mit der Größe unserer osmophilen Granula übereinstimmt. Diese Ergebnisse führten ihn ebenfalls zum Schlusse, daß die Frühstadien der Proplastiden neben geringen Mengen von Membranstoffen zur Hauptsache aus der chlorophyllführenden Masse bestehe, wobei diese mit der Granensubstanz gleichzusetzen wäre. Diese Ansicht ist durch unsere Untersuchung bestätigt worden. Erst durch die Stromabildung wird eine Differenzierung in einen stärker fluoreszierenden Bezirk und eine Randzone möglich. Im Vegetationskegel von *Elodea* ist das erst in der fünften oder sechsten Blattanlage zu beobachten (Düvel 1954). Die Zunahme der Fluoreszenz des Stromas ist nach unseren Bildern so zu erklären, daß beim Auswechseln der Lamellen das Chlorophyll ebenfalls auswandert. Ein wichtiges Problem bleibt noch die Abklärung der chemischen Zusammensetzung des Primärgranums. Wie die Fluoreszenz zeigt, ist das Chlorophyll hier lokalisiert. Seine Färbbarkeit mit lipophilen Farbstoffen wie Rhodamin B zeigt aber, daß auch Fette oder Lipoide vorhanden sind. Fetttröpfchen können im EM sowohl im Granum wie im Stroma beobachtet werden. Wieweit andere Substanzen, wie Eiweiß, Nucleinsäure etc., noch vorhanden sind, muß mit Hilfe der UV-Spektralanalyse abgeklärt werden.

5. Zusammenfassung

Die Struktur der verschiedenen Zellbestandteile, wie Mitochondrien, Sphärosomen, Fetttröpfchen und Proplastiden, wurde an Hand von EM-Aufnahmen kurz beschrieben. Die Proplastiden entwickeln sich in den embryonalen Zellen von *Aspidistra elatior* aus osmophilen Granula, die in Form und Größe den primären Granen entsprechen. Um diese Körper bil-

det sich das Stroma, das zahlreiche Assimilationsprodukte aufbaut (amyloplastische Proplastiden). Die Bildung der Stromalamellen erfolgt vom primären Granum aus, welches mit zunehmender Zahl der Lamellen verschwindet. Auf diese Entwicklungsphase folgt die Teilungsphase, aus der zwei funktionstüchtige Jungchloroplasten hervorgehen. Zum Schlusse wurden diese Ergebnisse mit den neueren lichtmikroskopischen Arbeiten verglichen.

Herrn Prof. Dr. A. Frey-Wyssling danke ich herzlich für seine Unterstützung während der Durchführung der Arbeit.

Literatur

Bernhard, W., A. Gautier et Ch. Rouiller, 1954: La notion de „microsomes" et le problème de la basophilie cytoplasmique. Étude critique et expérimentale. Arch. Anat. microsc. (Fr.) *43*, 236.

Bütschli, O., 1892: Untersuchungen über mikroskopische Schäume und das Protoplasma. Leipzig.

Buvat, R., 1953: Die Ursache und Deutung der Chondriosomenwandlungen. Endeavour *12*, 33.

Buy, H. G. du, and M. D. Lackey, 1950: Enzymatic activities of isolated normal and mutant mitochondria and plastids of higher plants. Science *111*, 372.

Chayen, J., and U. J. Miles, 1953: The preservation and investigation of plant mitochondria. Quart. J. microsc. Sci. *94*, Part 1, 29.

Claude, A., 1940: Particulate components of normal and tumor cells. Science *91*, 77.

Cohen, M., and E. Bowler, 1953: Lamellar structure of the tobacco chloroplast. Protoplasma *42*, 414.

Correns, C., und F. v. Wettstein, 1937: Nichtmendelnde Vererbung. Hdb. f. Vererbungswiss., Bd. II H.

Dangeard, P. A., 1919: Sur la distinction du chondriome des auteurs en vacuome, plastidome et sphérome. C. r. Acad. Sci. Paris *169*, 1005.

Drawert, H., 1952: Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Nilblausulfat. Ber. dtsch. bot. Ges. *65*, 263.

— 1953: Vitale Fluorochromierung der Mikrosomen mit Janusgrün, Nilblausulfat und Berberinsulfat. Ber. dtsch. bot. Ges. *66*, 134.

Düvel, D., 1954: Beiträge zur Kenntnis der Struktur und Entwicklung der Chloroplasten. Protoplasma *44*, 239.

Frey-Wyssling, A., 1938: Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate. Berlin (Bornträger).

— 1955: Die submikroskopische Struktur des Protoplasmas. Protoplasmatologia *2 A 2*. Wien.

— und E. Steinmann, 1953: Ergebnisse der Feinbau-Analyse der Chloroplasten. Vjschr. Naturf. Ges. Zürich *98*, 20.

Goddard, D. R., and H. Stafford, 1955: Localization of enzymes in the cells of higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. *5*, 115.

Grave, G., 1954: Studien über die Entwicklung der Chloroplasten bei *Agapanthus umbellatus*. Protoplasma *44*, 273.

Guilliermond, A., 1932: La structure de la cellule végétale: Les inclusions du cytoplasme et en particulier les chondriosomes et les plastes. Protoplasma *16*, 291.

Heitz, E., 1936: Untersuchungen über den Bau der Plastiden. I. Die gerichteten Chlorophyllscheiben der Chloroplasten. Planta *26*, 134.

— 1954: Kristallgitterstruktur des Granums junger Chloroplasten von *Chlorophytum*. Exper. Cell Res. *7*, 606.

— und R. Maly, 1955: Zur Frage der Herkunft der Grana. Z. Naturf. *8 b*, 243.

Hilwig, I., und H. Schmitz, 1951: Über Beziehungen zwischen Verfettung und Stoffwechselhemmung an Gewebekulturen durch Zusatz von Berberin. Naturwiss. *38*, 336.

Kaja, H., 1954: Untersuchungen über die Kontinuität der Granastruktur in den Plastiden der Moose. Ber. dtsch. bot. Ges. *67*, 93.

Küster, E., 1951: Die Pflanzenzelle. 2. Auflage. Jena.

Lang, K., 1952: Mikroskopische und chemische Organisation der Zelle. 2. Kolloq. dtsch. Ges. physiol. Chem. Berlin-Göttingen-Heidelberg.

Lettré, H., 1951: Zellstoffwechsel und Zellteilung. Naturwiss. *38*, 490.

Leyon, H., 1953: The structure of chloroplast. II. The first differentiation of the chloroplast structure in *Vallota* and *Taraxacum* studied by means of electron microscopy. Exper. Cell Res. *5*, 520.

— 1954 a: The structure of chloroplasts. IV. The development and structure of the *Aspidistra* chloroplast. Exper. Cell Res. *7*, 265.

— 1954 b: The structure of chloroplasts. VI. The origin of the chloroplast laminae. Exper. Cell Res. *7*, 609.

Marquardt, H., 1952: Die Natur der Erbträger im Zytoplasma. Ber. dtsch. bot. Ges. *65*, 198.

Millerd, A., and J. Bonner, 1953: The biology of plant mitochondria. J. Histochem. Cytochem. *1*, 254.

Mohl, H. v., 1844: Einige Bemerkungen über den Bau der vegetabilischen Zellen. Bot. Ztg. *2*, 273.

Mühlethaler, K., 1955: Untersuchungen über den Bau der Stärkekörner. Z. Mikrosk. (im Druck).

Newcomer, E. H., 1951: Mitochondria in plants. Bot. Rev. *17*, 53.

Palade, G. E., 1952: A study of fixation for electron microscopy. J. exper. Med. *95*, 285.

— 1953: An electron microscope study of the mitochondrial structure. J. Histochem. Cytochem. *1*, 188.

— 1955: A small particulate component of the cytoplasm. J. biophys. biochem. Cytology *1*, 59.

— and K. R. Porter, 1954: Studies on the endoplasmic reticulum. I. Its identification in cells in situ. J. exper. Med. *100*, 641.

Perner, E. S., 1952 a: Die Vitalfärbung mit Berberinsulfat und ihre physiologische Wirkung auf Zellen höherer Pflanzen. Ber. dtsch. bot. Ges. *65*, 52.

— 1952 b: Über die Veränderungen der Struktur und des Chemismus der Zelleinschlüsse bei der Homogenisation lebender Gewebe. Ber. dtsch. bot. Ges. *65*, 235.

— 1952 c: Zellphysiologische und cytologische Untersuchungen über den Nachweis und die Lokalisation der Cytochromoxydase in *Allium*-Epidermiszellen. Biol. Zbl. *71*, 43.

— 1953: Die Sphärosomen (Mikrosomen) pflanzlicher Zellen. Protoplasma *42*, 457.

— und G. Pfefferkorn, 1953: Pflanzliche Chondriosomen im Licht- und Elektronenmikroskop unter Berücksichtigung ihrer morphologischen Veränderung bei der Isolierung. Flora *140*, 98.

Porter, K. R., 1954: Electron microscopy of basophilic components of cytoplasm. J. Histochem. Cytochem. *2*, 346.
— and F. Kallman, 1953: The properties and effects of osmium tetroxide as a tissue fixative with special reference to its use for electron microscopy. Exper. Cell Res. *4*, 127.
Renner, O., 1934: Die pflanzlichen Plastiden als selbständige Elemente der genetischen Konstitution. Ber. math.-phys. Kl. Sächs. Akad. Wiss. Leipzig *86*, 241.
Rhodin, J., 1954: Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Diss. Stockholm.
Ritchie, D., and P. Hazeltine, 1953: Mitochondria in Allomyces under experimental conditions. Exper. Cell Res. *5*, 261.
Schimper, A. F. W., 1883: Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörner. Bot. Ztg. *41*, 105.
Sjöstrand, F. S., 1953: Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. Nature *171*, 30.
— and V. Hanzon, 1954: Membrane structures of cytoplasm and mitochondria in exocrine cells of mouse pancreas as revealed by high resolution electron microscopy. Exper. Cell Res. *7*, 393.
Sorokin, H. P., 1938: Mitochondria and plastids in living cells of *Allium cepa*. Amer. J. Bot. *25*, 28.
— 1941: The distinction between mitochondria and plastids in living epidermal cells. Amer. J. Bot. *28*, 476.
— 1955: Mitochondria and spherosomes in the living epidermal cell. Amer. J. Bot. *42*, 225.
Steinmann, E., and F. S. Sjöstrand, 1955: The ultrastructure of chloroplasts. Exper. Cell Res. *8*, 15.
Strugger, S., 1950: Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. Naturwiss. *37*, 166.
— 1951: Die Strukturordnung im Chloroplasten. Ber. dtsch. bot. Ges. *64*, 69.
— 1954a: Über die Struktur der Proplastiden. Ber. dtsch. bot. Ges. *66*, 439.
— 1954b: Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* L'Herit. Protoplasma *43*, 120.
Wettstein, F. v., 1928: Morphologie und Physiologie des Formwechsels der Moose auf genetischer Grundlage. Bibl. Genet. *10*, 1.

Kurze Mitteilung

Ein einfaches Mikrokolorimeter

Von

Helmut Kinzel

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 2 Textabbildungen

(Eingelangt am 19. März 1955)

Jeder Versuch der quantitativen Auswertung von Vitalfärbevorgängen stellt uns vor kolorimetrische Aufgaben. Wenn man nicht mit so extrem großen Zellen arbeitet wie Collander in seinen vielen Untersuchungen an Characeen, deren Zellsaft sich ohne Zuhilfenahme des Mikroskops analysieren läßt, dann ist man darauf angewiesen, kolorimetrische Messungen unter dem Mikroskop durchzuführen. Verfahren dazu wurden auch schon von verschiedenen Autoren angegeben.

Bereits Overton (1907, zit. nach Collander, Lönegren und Arhimo 1943) hat ein einfaches Verfahren angegeben: Feine Glaskapillaren, die mit Farbstofflösungen bekannter Konzentration gefüllt sind, werden neben das zu untersuchende Objekt unter das Deckglas gebracht. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Schichtdicken kann so der Farbstoffgehalt der Objekte abgeschätzt werden. Von industriell hergestellten Geräten wäre zu erwähnen das Leitzsche Mikrophotometer nach Berek, beschrieben bei Pfeiffer (1953), bei dem das von monochromatischem Licht durchstrahlte Objekt in der einen Hälfte des Gesichtsfeldes erscheint, während in der anderen Hälfte des Gesichtsfeldes ein abgezweigter Strahl des gleichen Lichtes, der durch Verdrehen von zwei Nicol-Prismen gegeneinander kontinuierlich geschwächt werden kann, die vergleichende Messung ermöglicht. Ebenfalls mit monochromatischem Licht arbeitet Bartels (1954) mit einer selbstzusammengestellten Apparatur, bei der an die Stelle des subjektiven Vergleiches die objektive Messung mittels einer Photozelle tritt. Ferner stellte die Firma Reichert vor Jahren ein Photometerokular nach Haschek und Haitinger (vgl. Haschek und Haitinger 1936) her. Auch hier erscheint — wie bei der Leitzschen Anordnung — das Objekt in einer Hälfte des Gesichtsfeldes, in der anderen Hälfte ein von einer besonderen Lichtquelle stammendes Vergleichslicht, das mittels einer quadratischen Meßblende kontinuierlich geschwächt werden kann. Der wesentliche Unterschied zum Mikrophotometer nach Berek besteht darin,

daß die beiden Lichtbündel, erst nachdem sie ihre definitive Lage zueinander erreicht haben — also unmittelbar unterhalb des Okulars —, ein Farbfilter passieren.

Sämtliche Geräte, die mit monochromatischem Licht arbeiten, haben den Vorteil, daß sich mit ihnen nicht nur Konzentrationsmessungen, sondern auch Bestimmungen von Absorptionskurven der Objekte über den ganzen Spektralbereich durchführen lassen. Dem steht der Nachteil gegenüber, daß sie für die Untersuchung fluoreszierender Objekte nicht verwendbar sind. Der große Vorteil des Apparates von Haschek und Haitinger, der von der Firma Reichert leider nicht mehr hergestellt wird, besteht darin, daß er sich auch für die Untersuchung fluoreszierender Objekte, allerdings nur zu Konzentrationsbestimmungen, eignet.

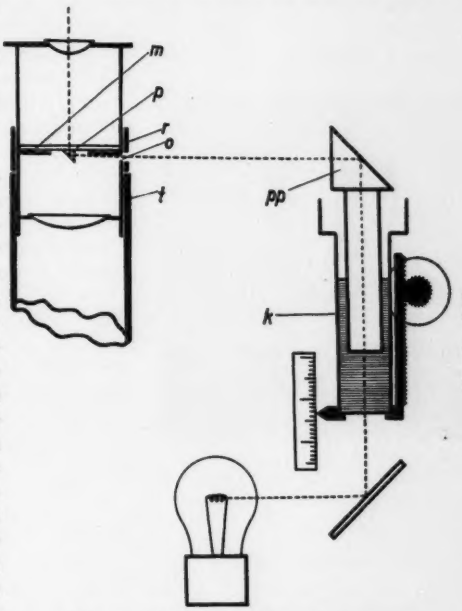


Abb. 1. Schema des Mikrokolorimeters.

Als ich selbst vor der Notwendigkeit mikrokolorimetrischer Messungen stand, arbeitete ich ein Gerät mit einer neuartigen optischen Kombination aus. Mich störte es zunächst, daß eine volle Gesichtsfeldhälfte im Vergleichslicht erscheinen soll. Je kleiner das Objekt ist, mit dem man arbeitet, desto schwieriger ist ein Farbtiefenvergleich mit einer so großen Vergleichsfläche. Ich versuchte daher zunächst, mit Hilfe eines Zeichenapparates einen kleinen, gefärbten Lichtfleck in das Gesichtsfeld hineinzuprojizieren, doch zeigte sich bald, daß die Helligkeit desselben je nach der Stellung des Auges zu dem über dem Okular befindlichen Prisma bedeutend schwankte. Die Lösung des Problems brachte die Möglichkeit, ein sehr kleines Prisma in der Höhe der Okularblende anzubringen, das durch eine seitlich am Okular angebrachte Öffnung das Vergleichslicht empfängt.

Ein Schema der Vorrichtung gibt Abb. 1. Auf die Blende des Okulars wird ein Okularmikrometer-Plättchen *m* gelegt, auf dessen Unterseite ein möglichst kleines Umkehrprisma *p* aufgekittet wurde. Das kleinste Prisma, das in Wien erhältlich war, hatte die Kathetenlänge 1,8 mm. Günstiger wäre ein noch kleineres Prisma. Das Okular wird in entsprechender Höhe mit einer Öffnung *o* sowie mit einem ebenfalls durchbohrten, federnden Metallring *r* versehen, der es daran hindert, ganz in den Mikroskoptubus *t* hineinzugleiten. Im Gesichtsfeld erscheint dann einerseits die Mikrometer-Einteilung, die zur Größenmessung der Objekte notwendig ist, anderseits ein scharf begrenzter Lichtfleck, dessen Breite etwa ein Viertel des Gesichtsfeld-

durchmessers beträgt, in der Farbe des seitlich eingestrahlten Vergleichslichtes. Eine weitere Verkleinerung dieses Vergleichs-Lichtfleckes würde, wie bereits gesagt, günstig wirken und wäre technisch durchaus möglich.

Das farbige Vergleichslicht, das seitlich eingestrahlt wird, liefert ein Eintauchkolorimeter, dessen Küvette mit einer verdünnten Lösung desselben Farbstoffes gefüllt ist, mit dem die Vitalfärbung durchgeführt wird. Dieses Kolorimeter *k* erhält sein Licht von der gleichen Lichtquelle wie das Mikroskop, um einer Farbtonveränderung durch unterschiedliche Lichtqualität vorzubeugen. Oben ist ein zweites Umkehrprisma *pp* aufgesetzt, das das farbige Lichtbündel in die seitliche Öffnung des Okulars wirft.

Vor der Untersuchung vitalgefärbter Zellen muß das Instrument mit einer Farbstofflösung bekannter Konzentration geeicht werden. Dies geschieht am bequemsten mit einer der bekannten Blutkörperchen- bzw. Bakterien-Zählkammern, die eine genau bekannte Schichtdicke, z. B. 0,1 mm, besitzen. Zunächst wird die Küvette des Kolorimeters mit einer verdünnten Lösung des zu untersuchenden Farbstoffes gefüllt und bis zum Anschlag nach oben geschraubt, so daß das durchfallende Licht ungefärbt ist. Sodann wird der Mikroskoptubus auf eine der Dicke der Zählkammern entsprechende Höhe gebracht und der Vergleichslichtfleck zum übrigen Gesichtsfeld auf gleiche Helligkeit eingestellt. Dieser letztere Vorgang, der die bei der Verschiebung des Tubus auftretenden Helligkeitsschwankungen kompensiert, erfolgte bei der einfachen Ausführung des Gerätes durch eine Verdrehung des unter dem Kolorimeter befindlichen Spiegels. (Für erhöhte Ansprüche an die Meßgenauigkeit wäre an den Einbau von zwei Nicol-Prismen zu denken.) Nun werden in die Zählkammer nacheinander verschiedene Konzentrationen der zu untersuchenden Farbstofflösung eingefüllt, worauf die Kolorimeterküvette bis zur Farbgleichheit von Gesichtsfeld und Vergleichslichtfleck verschoben wird. Wird der abgelesene Skalenwert durch die Schichtdicke der Zählkammer in μ dividiert, dann läßt sich aus den erhaltenen Werten eine Eichkurve zeichnen, aus der sich der Skalenwert je μ Schichtdicke des Objektes für verschiedene Farbkonzentrationen entnehmen läßt, der den Beobachtungen an Objekten unbekannter Farbstoffkonzentration zugrunde gelegt wird. Natürlich muß die in der Küvette befindliche Vergleichslösung bei Eichung und Messung dieselbe sein. Da bestimmte Zellen manche Farbstoffe sehr stark speichern, empfiehlt es sich, zur Eichung auch konzentrierte Farbstofflösungen heranzuziehen. Dabei kommt es vor, daß die Schichtdicke der Zählkammer zu groß ist, um noch genügend Licht durchzulassen. In diesem Falle kann man sich so helfen, daß man einen Farbstofftropfen bekannten Volumens (auswägen oder Mikrobürette) zwischen einem normalen Objektträger und einem Deckglas sich ausbreiten läßt, wobei sich aus dem Volumen des Tropfens und der Fläche des Deckglases die Schichtdicke berechnen läßt. Es gibt auch

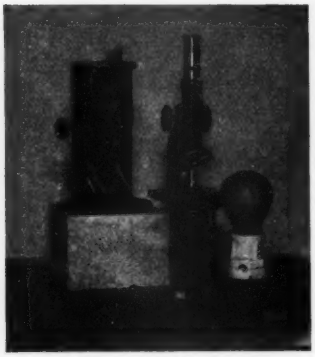


Abb. 2. Ansicht der Versuchsausführung des Apparates.

Farbstoffe, die in konzentrierter Lösung einen anderen Farbton aufweisen als in verdünnter, so daß bei der Eichung der Vergleichslichtfleck eine andere Farbe hat als das übrige Gesichtsfeld. Dadurch kann eine Änderung des Farbtones der Vergleichslösung erforderlich werden, die entweder durch Änderung des pH-Wertes oder durch Beimengung eines anderen Farbstoffes zu erreichen ist. Dies scheint zunächst eine unpraktische Komplikation zu sein. Jedem, der Vitalfärbeerscheinungen beobachtet hat, wird hingegen bekannt sein, daß die mit einem und demselben Farbstoff gefärbten Zellen sehr verschiedene Farbtöne zeigen können. Durch diese metachromatischen Erscheinungen wird oft das Absorptionsspektrum des Farbstoffes bedeutend verschoben, so daß bei Konzentrationsmessungen mit Geräten, die mit monochromatischem Licht arbeiten, große Fehler entstehen können. Stellt man hingegen die Vergleichslösung des hier beschriebenen Apparates auf einen zwischen den beobachteten Extremen liegenden Farbton ein, dann kann die Einstellung auf gleiche Helligkeit auch bei metachromatisch gefärbten Zellen noch mit einiger Genauigkeit durchgeführt werden. Ein weiterer Vorteil des Gerätes liegt, wie bereits erwähnt, darin, daß der Vergleichslichtfleck nur klein ist. Er ist daher auch bei Betrachtung kleinerer Objekte weitgehend vom gefärbten Objekt umgeben, was eine Einstellung auf gleiche Helligkeit sehr erleichtert und die Meßgenauigkeit vergrößert. Bei isodiametrischen oder zylindrischen Objekten kann zudem die Dicke des Objektes direkt an der im Okular eingebauten Mikrometereinteilung abgelesen werden.

Das Gerät kann auch für die Messung von Fluoreszenz-Intensitäten verwendet werden. Dazu ist es notwendig, daß man das Vergleichslicht von Farbig nach Schwarz variieren kann. Dies läßt sich dadurch erreichen, daß das seitliche Lichtbündel durch ein mit der Vergleichslösung gefülltes Polarimeter (mit einfachen Nicol-Prismen) geleitet wird, wobei dann durch Verdrehen des einen Nicol-Prismas auf gleiche Helligkeit eingestellt werden kann. Eine Eichung ist hier allerdings durch die an biologischen Objekten auftretenden mannigfachen Fluoreszenzlöschungs- und Metachromasie-Erscheinungen sehr in Frage gestellt, so daß über die Absolutmenge des vom Objekte aufgenommenen Farbstoffes sich weder mit diesem noch mit einem anderen Meßgerät etwas ganz Sicheres sagen läßt. Relativmessungen sind jedoch sehr gut möglich.

Literatur

Bartels, P., 1954: Quantitative mikrospektroskopische Untersuchung der Speicherungs- und Permeabilitätsverhältnisse akridinorangegefärbter Zellen. Planta *44*, 341.

Collander, R., H. Lönegren und E. Arhimo, 1943: Das Permeationsvermögen eines basischen Farbstoffes mit demjenigen einiger Anelektrolyte verglichen. Protoplasma *37*, 527.

Haschek, E., und M. Haitinger, 1936: Farbmessungen, theoretische Grundlagen und Anwendungen. Haim & Co., Wien-Leipzig.

Overton, E., 1907: In: Handbuch der Physiologie des Menschen. Hrsg. von W. Nagel, Braunschweig.

Pfeiffer, H. H., 1953: Messungen des Silber-Dichroismus an Amyloid-Komplexen in vitro. Exper. Cell. Res. *5*, 443.

Referat

Paech, K., und M. V. Tracey: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. 2. Bd. Mit 48 Abb. 626 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag. 1955. DM 110.—.

Mit diesem Handbuch haben sich dessen Herausgeber Paech und Tracey einer ebenso schwierigen und umfangreichen wie auch notwendigen Aufgabe unterzogen. Schier unzählig sind die Methoden, ohne die die in letzter Zeit erzielten Fortschritte der Stoffwechselphysiologie undenkbar wären; aber auch die anderen Zweige der Botanik, die Sippensystematik nicht ausgenommen, die Pharmakognosie, die Lebensmittelchemie kann heute spezieller chemischer Methoden nicht entraten. Die in Betracht kommenden Methoden sind aber in der Literatur weit verstreut und selbst dem Chemiker nicht immer leicht greifbar. Sie wurden von erfahrenen Fachleuten gesammelt, kritisch gesichtet und im vorliegenden Werk zusammengestellt. Der als erster erschienene zweite Band enthält außer dem lose beigegebenen Vorworte zum Gesamtwerk die Abschnitte über Mono- und Oligosaccharide und deren Abkömmlinge (Bell, Barker) sowie über die Inosite (Dangschat). Eine ausführliche Behandlung erfährt die Ascorbinsäure durch Franke. Die Abschnitte über die phosphorylierten Zucker (Benson) sind angesichts der heute im Fluß befindlichen Forschungen über die Photosynthese sowie den dissimilatorischen Stoffwechsel wohl besonders aktuell. Eingehend werden die Polysaccharide (Whelan), die Zellulose (Jermyn) und die Pektine (Henglein) behandelt. Für die Abschnitte über Chitin zeichnet Tracey, Gummi und Schleime Hirst und Jones und die Glukoside Trim. Ferner enthält der Band noch die Abschnitte über die Fette und anderen Lipoide (Meara), die flüchtigen Alkohole, Aldehyde und Ester (Scarisbrick), während die nichtflüchtigen Säuren von Wolf bzw. Ranson behandelt werden. Ein kurzes Kapitel über Laktone schließt den Band (Haynes).

Die Abschnitte sind teils in deutscher, mehrteils in englischer Sprache abgefaßt und beschränken sich ausschließlich auf die analytische Seite; Angaben über das Vorkommen von Pflanzenstoffen werden nur in Ausnahmefällen beigegeben. Der Biologe wird bedauern, daß die im älteren Kleinschen Handbuch der Pflanzenanalyse eingeschlagene Linie nicht beibehalten und fortgeführt worden ist, daß hier die Pflanze völlig hinter ihrem Chemismus, das stoffliche Geschehen ganz hinter der Analytik zurücktritt. Man muß jedoch den Herausgebern zustimmen, daß die Beibehaltung der Kleinschen Konzeption in Anbetracht des ungeheuren, mittlerweile erarbeiteten Materials das Werk zu einem „uferlosen Unternehmen" gemacht hätte. Schon die Beschränkung auf das rein Analytische hat die Aufteilung des Stoffes auf vier Bände nötig gemacht. Die Gliederung ist sehr übersichtlich und weitgehend, so daß man sich, namentlich an Hand des zweisprachigen Registers, leicht zurechtfindet. Die Darstellung der Arbeitsmethoden der Extraktion, Separation (inkl. Chromatographie usw.), Identifizierung und quantitativen Bestimmung der Pflanzenstoffe ist oft knapp, aber stets so, daß der analytisch einigermaßen Bewanderte danach arbeiten kann; kritische Anmerkungen über Fehlermöglichkeiten und Anwendungsgrenzen entstammen vielfach persönlichen Erfahrungen der Bearbeiter. Jedem Abschnitt ist ein reichhaltiges Literaturverzeichnis angefügt.

Es fällt nicht schwer, bereits auf Grund des bisher vorliegenden Bandes vorherzusagen, daß hier ein Standardwerk entsteht, das für den chemisch arbeitenden Biologen, den Chemiker, überhaupt für jeden, der irgendwie mit Pflanzenchemie und Pflanzenanalyse zu tun hat, unentbehrlich sein wird.

O. Härtel (Graz).

Herausgeber, Eigentümer und Verleger: Springer-Verlag, Wien I, Mölkerbastei 5. — Für den Inhalt verantwortlich: Prof. Dr. Friedl Weber, Graz, Schubertstr. 51, Prof. Dr. Josef Spek, Rostock, Zoologisches Institut, und Prof. Dr. Karl Höfler, Universität Wien. — Druck: Adolf Holzhausens Nfg., Wien VII, Kandlg. 19-21

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

Diskus, A.: Färbestudien an den Schleimkörperchen und Schleimausscheidungen einiger Euglenen 1. 3. 1955

Erdmann, K.: Versuche zur Aufhebung der koagulierenden Wirkungen von ultraviolettem Licht und von Röntgenstrahlen auf Euglobulin mit Strahlen-Schutzstoffen 14. 3. 1955

Reiter, Liselotte: Zerfall homogener *Epiphyllum*-Eiweißspindeln in Fibrillen 8. 4. 1955

Badenhuizen, N. P.: The Structure of the Starch Granule 13. 4. 1955

Kamiya, N., and M. Tazawa: Studies on Water Permeability of a Single Plant Cell by Means of Transcellular Osmosis 30. 4. 1955

Arndt, A.: Histologische und histochemische Untersuchungen über die Oogenese und bipolare Differenzierung von Süßwasser-Teleosteern 15. 5. 1955

Woohsmann, H.: Die Fällungsmetachromasie der chromotropen Substanzen der Ciliaten und Flagellaten 15. 5. 1955

Weihe, K. v.: Die Bedeutung der Grenzflächenenergie für die Gestaltung der Zelle 24. 5. 1955

Huber, Elfriede: Über den schädigenden Einfluß von Neutralrot auf *Spirogyra*-Zellen 28. 5. 1955

Stalfelt, M. G.: The Protoplasmic Viscosity of Terrestrial Plants and Its Sensitivity to Light 3. 6. 1955

Tschermak-Woess, Elisabeth: Karyologische Pflanzenanatomie 12. 6. 1955

Flasch, Assunta: Die Festigkeit der Bindung einiger basischer Farbstoffe in vitalgefärbten Pflanzenzellen 14. 6. 1955

Miličić, D., und Biljana Plavšić: Eiweißkristalloide in Kakteen-Virusträgern 15. 6. 1955

Woohsmann, H.: Der Stand des Metachromasie-Problems 21. 6. 1955

Weber, F.: Eiweißspindeln und -kristalle in *Scutellaria* 3. 7. 1955

Bairati, A., and F. E. Lehmann: Structural and chemical properties of the contractile vacuole of *Amoeba proteus* 11. 7. 1955

Currier, H. B., and S. Strugger: Aniline Blue and Fluorescence Microscopy of Callose in Bulb Scales of *Allium cepa* L. 11. 7. 1955

Strugger, S., und M. Losada-Villasante: Die Plastiden in den albicaten Geweben der Blätter einer mediovariegaten Form von *Chlorophytum comosum* 11. 7. 1955

Bünning, E., G. Hunck und H. Lutz: Über die Rolle longitudinaler und radialer Polaritätsgradienten bei der Gewebedifferenzierung von Pflanzen 18. 7. 1955

Kaho, H.: Untersuchungen über die antagonistische Wirkung von Mono- und Disacchariden und chemisch nahestehenden Stoffen bei der Wirkung einiger Elektrolyte auf das Pflanzenplasma. I. Mitt. 22. 7. 1955

Höfler, K., W. Url und A. Diskus: Speicherkonkurrenz im Protoplasten einiger Meeresalgen bei Rhodamin-B-Färbung 24. 7. 1955

Sinapius, D., und W. Schreil: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Cytoplasma des Aortenendothels 3. 8. 1955

Jonas, H.: A Study of the Dynamics of K^{42} Uptake by Sunflower Plants with the Aid of a Scintillation Count-Rate Meter 19. 8. 1955

Thaler, Irmtraud: Die Plastiden der *Cerinthe*-Epidermis 22. 8. 1955

Reiter, Liselotte: Einschlüsse im Zellkern von *Campanula* 26. 8. 1955

Reiter, Liselotte: Eiweißwürfel in *Solanum demissum* 2. 9. 1955

Thaler, Irmtraud: Eiweißkristalloide von *Lilium tigrinum* 2. 9. 1955

Alcer, G.: Die Aufnahme von Harnstoff und Glycerin durch die Pflanzenzelle in Abhängigkeit von der Acidität der Außenlösung und des Zellsaftes . . 5. 9. 1955

Reiter, Liselotte: Virus-Übertragung zwischen *Aichryson*-Arten 8. 9. 1955

SPRINGER-VERLAG IN WIEN I

Archiv für die gesamte Virusforschung

Begründet von **R. Doerr**

Unter Mitwirkung hervorragender in- und ausländischer Fachleute

herausgegeben von

C. Hallauer (Bern) — **K. F. Meyer** (San Francisco) — **E. G. Nauck** (Hamburg)

Zuletzt erschien:

Band 6, Heft 2—3. (Abgeschlossen im Mai 1955.) Mit 57 Textabbildungen. 189 Seiten. 1955. S 216.—, DM 36.—, sfr. 37.—, $ 8.60

Inhaltsverzeichnis: **Siegert, R.** Die onkolytischen Eigenschaften von Viren. — **Yaoi, Hidetake,** and **Yasuo Kimura.** On Therapeutical Effects of Purified Vaccine Lymph (P. V. L.) against X-Ray Injury in Mice. — **Hirtz, J.** Electrophoretic Properties of Foot and Mouth Disease Virus. — **Brand, G.,** und **H. Lippelt.** Über den Influenza-Virus-Rezeptor formalinisierter Erythrozyten. — **Tongeren, H. A. E. van, J. B. Wilterdink, R. Wyler,** and **E. Richling.** Encephalitis in Austria. III. — **Tongeren, H. A. E. van.** Encephalitis in Austria. IV. — **Krieg, A.** Untersuchungen über die Polyedrose von *Neodiprion sertifer*. — **Verlinde, J. D., A. Kret,** and **R. Wyler.** The Distribution of Poliomyelitis Virus in Cynomolgus Monkeys Following Oral Administration, Tonsillectomy, and Intramuscular Injection of Diphteria Toxoid. — **Kaim, H.** Zur histologischen Diagnose Poliomyelitis im Tierexperiment. — **Sackmann, W.** Über die Züchtung und Zytopathogenität des Schweineinfluenzavirus (SIV) in der Hühnergewebekultur. — **Johnsson, T.** Occurrence of Coxsackie Virus Infections in an Epidemic of Poliomyelitis. — **Johnsson, T.** A Non-Typable Cytopathic Agent as the Probable Cause of a Family Outbreak of Aseptic Meningitis. — **Johnsson T.** Simultaneous Recovery of Two or More Immunological Types of Coxsackie Virus from the same Patient. — **Johnsson, T.** The Occurrence of Coxsackie Virus in a Hospital Material of Paralytic Poliomyelitis, Aseptic Meningitis and a Miscellaneous Group of Diseases. — **Johnsson, T.,** and **C. Lundmark.** A Histopathological Study of Coxsackie Virus Infections in Mice.

Österreichische Botanische Zeitschrift

Herausgegeben von

L. Geitler, Wien

Zuletzt erschien:

Band 102, Heft 2—3. (Ausgegeben im August 1955.) Mit 101 Textabbildungen. 264 Seiten. 1955. S 342.—, DM 57.—, sfr. 58.50, $ 13.60

Inhaltsverzeichnis: **Porsch, O.** Zur Biologie der *Catasetum*-Blüte. — **Doležal, R.,** und **E. Tschermak-Woess.** Verhalten von Eu- und Heterochromatin und interphasisches Kernwachstum bei *Rhoeo discolor*; Vergleich von Mitose und Endomitose. — **Leinfellner, W.** Beiträge zur Kronblattmorphologie. VI. Die Nektarblätter von *Berberis*. — **Ehrendorfer, F.** Hybridogene Merkmals-Introgression zwischen *Galium rubrum* L. s. str. und *G. pumilum* Murr. s. str. — **Geitler, L.** Lebensweise, Fortpflanzung und Wachstumsvorgänge bei *Cyanophanon mirabile*, n. gen., n. sp., einem merkwürdigen, Blaualgen-ähnlichen Organismus. — **Hartmann-Dick, U.,** und **W. Müller-Stoll.** Zytomorphologische Studien über das normale und pathologische Verhalten von Pollenschläuchen in künstlicher Kultur. — **Wawrik Friederike.** Die jahreszeitlichen Aspekte im Pelagial der Seebachlacke. — **Geitler, L.** Gehäufte Haustorien bei einer Collematacee. — **Leinfellner, W.** Beiträge zur Kronblattmorphologie. VII. Die Kronblätter einiger Linaceen. — **Korica, B.** Neue Formen von *Asperula scutellaris* Vis. und ihre morphologisch-geographische und klimatische Bedeutung. — **Cufodontis, G.** Intraspezifische Gliederung polymorpher Arten von *Pittosporum* aus Madagaskar und Beschreibung einer neuen Art aus Rodrigues. — *Besprechungen.*

Zu beziehen durch jede Buchhandlung